NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

DR. L. HEILMEYER
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. W. HEUBNER †
EM. PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
HEIDELBERG

DR. P. HOLTZ
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
FRANKFURT

DR. L. LENDLE
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
GÖTTINGEN

230. BAND

MIT 163 TEXTABBILDUNGEN

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1957

Alle Rechte vorbehalten.
Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages
ist es auch nicht gestattet, einzelne Beiträge oder Teile daraus
auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.
Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg
Printed in Germany

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Warenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften

Inhalt des 230. Bandes

Seite

Achinstein, B., s. **Pradhan, S. N.,** and **M. J. Shear.**

Behrens, B., und **L. Schlosser,** Beitrag zur Bestimmung der LD_{50} und der Berechnung ihrer Fehlerbreite. Mit 2 Textabbildungen 59

Bock, K. D., H. Dengler, H. M. Kuhn und **K. Matthes,** Die Wirkung von 5-Hydroxytryptamin auf Blutdruck, Haut- und Muskeldurchblutung des Menschen. Mit 9 Textabbildungen 257

Broghammer, H., K. Takagi und **H. Schaefer,** Die Wirkung von Lysergsäure-Diäthylamid (LSD) und Urethan auf die Tätigkeit eines sympathischen Ganglions. Mit 4 Textabbildungen 358

Brunner, H., G. Kusc husky, O. Münchow und **G. Peters,** Der Einfluß von natürlichem und synthetischem Oxytocin auf endogene Kreatinin-Clearance, Salzausscheidung und Säureausscheidungsfähigkeit der Ratte und auf die Diurese des Menschen. Mit 1 Textabbildung 80

Brücke, F., H. Petsche, S. Sailer und **Ch. Stumpf,** Apomorphinwirkung auf das Kaninchen-EEG. Mit 6 Textabbildungen 335

Burger, M., Veränderungen der Adrenalin und Noradrenalinkonzentrationen im menschlichen Blutplasma unter Reserpin. Mit 2 Textabbildungen . . 489

—, s. **Kägi, J.,** und **K. Giger.**

Busch, E., und **H. Langecker,** Die chemischen und pharmakologischen Eigenschaften von 7-(β-Isopropylamino-propyl)-theophyllin 194

Cerhová, M., s. **Lindaur, V.**

Csornay, M., s. **Gottsegen, G.,** und **I. Szám.**

Decsi, L., Über die kombinierte Wirkung von Luminal-Na und Analeptica auf die Phosphatesterbildung bzw. Atmungskettenphosphorylierung von Rattengehirnhomogenaten 547

—, und **J. Méhes,** Über den biochemischen Mechanismus der Phenothiazinwirkung 462

Dengler, H., s. **Bock, K. D., H. M. Kuhn** und **K. Matthes.**

Desaulles, P., s. **Meier, R.**

Dessi, P., Über die Wirkung von Vitamin B_{12} und die Krebserzeugung durch Buttergelb. Mit 1 Textabbildung 499

Domenjoz, R., K. Mörsdorf, E. G. Stenger und **W. Theobald,** Der Einfluß der Narkose auf die Wirkung von Natriumsalicylat und Phenylbutazon (Butazolidin Geigy) am experimentellen Pfotenödem der Ratte 325

Emrich, D., s. **Wöhler, F., L. Heilmeyer** und **Shin Ho Kang.**

Engelhardt, G., und **F. Roser,** Versuch eines experimentellen Nachweises von anaphylaktischen Reaktionen am sympathischen Ganglion. Mit 2 Textabbildungen 90

Erdmann, W.-D., und **L. Lendle,** Toxicität und Elimination von esteraseblokkenden Alkylphosphaten und Eserin bei Dauerinfusionen 208

Erlenmeyer, H., s. **Fallab, S.**

Ertel, Ch., s. **Langecker, H.**

Fallab, S., und **H. Erlenmeyer,** Zur quantitativen Bewertung von Metallkomplexbildnern 205

Flemming, K., Über die Wirkung sympathicolytischer und parasympathicolytischer Pharmaka auf die Flimmerverschmelzungsgrenze. Mit 3 Textabbildungen 328

Seite

Friebel, H., A. v. Graevenitz und **E. Vreden,** Eine tierexperimentelle Methode zur O_2- und CO_2-Bestimmung in der Atemluft nach Arbeit. Mit 1 Textabbildung 51

Garrett, J., s. **Malafaya-Baptista, A., W. Osswald** und **M. F. Malafaya-Baptista.**

Gertner, S. B., and **H. Reinert,** The Role of Potassium Ions and Amino Acid Anions in the Reaction of Denervated Ganglion Cells. With 3 Figures in the text 347

Geske, G., und **H. H. Weber,** Gibt es eine Kontraktion von Muskelmodellen ohne ATP-Spaltung? 310

—, **M. Ulbrecht** und **H. H. Weber,** Der Einfluß der Mg-Konzentration auf die Substrathemmung der ATP-Spaltung — als angebliche Ursache der Erschlaffung des Muskels. Mit 4 Textabbildungen 301

Ghiassi, K., s. **Wöhler, F.**

Giger, K., s. **Kägi, J.,** und **M. Burger.**

Gottsegen, G., I. Szám und **M. Csornay,** Wirkung synthetischer Hibernatoren auf das experimentelle Lungenödem. Mit 3 Textabbildungen 435

Göldel, L. F., s. **Werle, E.,** und **R. Vogel.**

Graevenitz, A. v., s. **Friebel, H.,** und **E. Vreden.**

Gross, F., und **F. Sulser,** Der Einfluß der Nebennieren auf die blutdrucksteigernde Wirkung von Renin und auf pressorische Substanzen in den Nieren. Mit 4 Textabbildungen 274

Grupp, G., s. **Janssen, S.**

Habermann, E., Beiträge zur Pharmakologie von Phospholipase A. Mit 3 Textabbildungen 538

Harwart, A., K.-H. Kimbel und **H. Langecker,** Die Beurteilung von Resorption und Ausscheidung der Gallekontrastmittel. I. Mitteilung . . . 367

Härtfelder, G., und **G. Kuschinsky,** Theophyllinwirkungen am Herzlungenpräparat der Katze. Mit 2 Textabbildungen 386

Heilmeyer, L., s. **Wöhler, F., D. Emrich** und **Shin Ho Kang.**

Herken, H., G. Senft und **J. Schaper,** Die Beteiligung des Vasopressins an der Entstehung des Ödems. Mit 6 Textabbildungen 284

—, **D. Maibauer** und **S. Müller,** Acetylcholingehalt des Gehirns und Analgesie nach Einwirkung von Morphin und einigen 3-Oxymorphinanen. Mit 1 Textabbildung 313

—, **G. Senft** und **H. Wilutzky,** Die Retention der Lithium-Ionen bei Störungen des Salz- und Wasserhaushaltes. Mit 2 Textabbildungen 524

Heubner, W. †, W. Junge und **W. Koransky,** Über die Oxydation des Hämoglobins mit Hypochlorit. XXXIII. Mitteilung: Studien über Methämoglobinbindung. Mit 6 Textabbildungen 421

Hille, H., und **H.-J. Teske,** Über die Wirkung von 2-Methyl-2-Hydroxy-6-Aminoheptan (MH) auf Kreislauf und Atmung. Mit 6 Textabbildungen 142

Janssen, S., und **G. Grupp,** Untersuchungen über die Temperaturverteilung in der Niere des Hundes. Mit 8 Textabbildungen 245

Jaques, R., J. Tripod und **R. Meier,** Wechselwirkungen zwischen Schwermetallsalzen, insbesondere Kupfersalzen, und verschiedenen Pharmaka an den Coronargefäßen des isolierten Herzens. Mit 5 Textabbildungen . 26

Junge, W., s. **Heubner, W. †,** und **W. Koransky.**

Kang, Shin Ho, s. **Wöhler, F., L. Heilmeyer** und **D. Emrich.**

Seite

Kägi, J., M. Burger und **K. Giger,** Modifikationen zur Fluorescenzmethode von WEIL-MALHERBE und BONE zur Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin im menschlichen Blutplasma. Mit 1 Textabbildung 470

—, Veränderungen der Adrenalin- und Noradrenalinkonzentrationen im menschlichen Blutplasma während der Äthernarkose 479

Kimbel, K.-H., s. **Harwart, A.,** und **H. Langecker.**

Klissiunis, N., Zögerung des Eintritts der Strophanthinwirkung durch Polyvinylpyrrolidon 432

Koransky, W., s. **Heubner, W.†,** und **W. Junge.**

Körte, M., s. **Wöhler, F.**

Kröger, H., s. **Stille, G.**

Kuhn, H. M., s. **Bock, K. D., H. Dengler** und **K. Matthes.**

Kuschinsky, G., s. **Brunner, H., O. Münchow** und **G. Peters.**

—, s. **Härtfelder, G.**

Langecker, H., und **Ch. Ertel,** Das Schicksal der β-(4-Hydroxy-3,5-dijodphenyl-)-α-phenylpropionsäure im Organismus des Hundes. Mit 1 Textabbildung 374

—, s. **Harwart, A.,** und **K.-H. Kimbel.**

—, s. **Busch, E.**

Lembeck, F., Untersuchungen über die Auslösung afferenter Impulse. Mit 3 Textabbildungen 1

Lendle, L., s. **Erdmann, W.-D.**

Leuschner, F., Ausscheidungsprodukte des Salyrgans im Harn. Mit 2 Textabbildungen 513

Lindaur, V., und **M. Cerhová,** Beziehung zwischen Chloropromazin und dem Fettgehalt des Blutserums 174

Malafaya-Baptista, A., J. Garrett, W. Osswald und **M. F. Malafaya-Baptista,** p_H-Beeinflussung der Aminoxydase-Aktivität. Mit 2 Textabbildungen . . 10

Malafaya-Baptista, M. F., s. **Malafaya-Baptista, A., J. Garrett** und **W. Osswald.**

Maibauer, D., s. **Herken, H.,** und **S. Müller.**

Maske, H., und **K. Weinges,** Untersuchungen über das Verhalten der Meerschweinchen gegenüber verschiedenen diabetogenen Noxen. Alloxan und Dithizon. Mit 3 Textabbildungen 406

Matthes, K., s. **Bock, K. D., H. Dengler** und **H. M. Kuhn.**

Méhes, J., s. **Decsi, L.**

Meier, R., und **P. Desaulles,** Erreichung eines konstanten Wirkungsniveaus durch aufeinanderfolgende Dosen von Testosteronestern. Mit 3 Textabbildungen 73

—, s. **Jaques, R.,** und **J. Tripod.**

Mercker, H., und **F. Roser,** Über Kreislauf- und Stoffwechselreaktionen bei der spezifischen Behandlung der Blausäurevergiftung. Mit 7 Textabbildungen 125

Miescher, G., und **M. Speck,** Die Beeinflussung der bactericiden Wirkung des Hautfettes durch die Aminosäuren der Hautoberfläche. Mit 5 Textabbildungen 223

Mosinger, B., und **M. Špačková,** In technischer Zusammenarbeit mit **F. Ruffer,** Über die Beziehung zwischen der Wirksamkeit von Digitoxin und einigen biologischen Faktoren. Mit 2 Textabbildungen 45

Mörsdorf, K., s. **Domenjoz, R., E. G. Stenger** und **W. Theobald.**

Seite

Müller, S., s. **Herken, H.**, und **D. Maibauer.**

Münchow, O., s. **Brunner, H., G. Kuschinsky** und **G. Peters.**

Oettel, H., und **G. Wilhelm**, Vergleichende Prüfung von 14 cytostatisch wirksamen Produkten an 7 Tiertumoren. Mit 9 Textabbildungen 559

Osswald, W., s. **Malafaya-Baptista, A., J. Garrett** und **M. F. Malafaya-Baptista**

Peters, G., s. **Brunner, H., G. Kuschinsky** und **O. Münchow.**

Petsche, H., s. **Brücke, F., S. Sailer** und **Ch. Stumpf.**

Pradhan, S. N., B. Achinstein and **M. J. Shear**, Independence of Drug-Induced Damage in Sarcoma 37 and Carotid Blood Pressure in Mice . . 228

Quadbeck, G., und **G. D. Sartori**, Über den Einfluß von Pyridoxin und Pyridoxal-5-phosphat auf den Thiosemicarbazid-Krampf der Ratte 457

Reinert, H., s. **Gertner, S. B.**

Repke, K., Die Kinetik der Umsetzung von Oestron und Oestradiol-17β durch Hefe. Mit 7 Textabbildungen 178

Roewer, F., und **E. Werle**, Verhinderung der Isonicotinyl-Isoprophylhydrazid-(Iproniazid-Marsilid)-Hemmung der Monaminoxydase durch Blut in vitro. Mit 1 Textabbildung 552

Roser, F., s. **Engelhardt, G.**

—, s. **Mercker, H.**

Sailer, S., und **Ch. Stumpf**, Reserpinwirkung auf das Kaninchen-ECG. Mit 2 Textabbildungen 378

—, s. **Brücke, F., H. Petsche** und **Ch. Stumpf.**

Sartori, G. D., s. **Quadbeck, G.**

Schaefer, H., s. **Broghammer, H.**, und **K. Takagi.**

Schaper, J., s. **Herken, H.**, und **G. Senft.**

Schlosser, L., s. **Behrens, B.**

Selye, H., Über die humorale Beeinflussung des experimentellen Lathyrismus. Mit 1 Textabbildung 155

Senft, G., s. **Herken, H.**, und **H. Wilutzky.**

—, s. **Herken, H.**, und **J. Schaper.**

Shear, M. J., s. **Pradhan, S. N.**, and **B. Achinstein.**

Špačková, M., s. **Mosinger, B.**

Speck, M., s. **Miescher, G.**

Stenger, E. G., s. **Domenjoz, R., K. Mörsdorf** und **W. Theobald.**

Stille, G., und **H. Kröger**, Das Verhalten der Elektrolyte in Blut und Gehirn unter der Wirkung von Analepticis. Mit 2 Textabbildungen 14

Stumpf, Ch., s. **Brücke, F., H. Petsche** und **S. Sailer.**

—, s. **Sailer, S.**

Sulser, F., s. **Gross, F.**

Szám, I., s. **Gottsegen, G.**, und **M. Csornay.**

Takagi, K., s. **Broghammer, H.**, und **H. Schaefer.**

Teske, H.-J., s. **Hille, H.**

Theobald, W., s. **Domenjoz, R., K. Mörsdorf** und **E. G. Stenger.**

Trendelenburg, U., Reaktion sympathischer Ganglien während der Ganglienblockade durch Nicotin. Mit 5 Textabbildungen 448

Tripod, J., s. **Jaques, R.**, und **R. Meier.**

Ulbrecht, M., s. **Geske, G.**, und **H. H. Weber.**

Vogel, R., s. **Werle, E.**, und **L. F. Göldel.**

Seite

Vreden, E., s. **Friebel, H.,** und **A. v. Graevenitz.**

Weber, H. H., s. **Geske, G.,** und **M. Ulbrecht.**

—, s. **Geske, G.**

Weinges, K., s. **Maske, H.**

Werle, E., R. Vogel und **L. F. Göldel,** Über ein blutdrucksteigerndes Prinzip in Extrakten aus der Glandula submaxillaris der weißen Maus. Mit 9 Textabbildungen 236

—, s. **Roewer, F.**

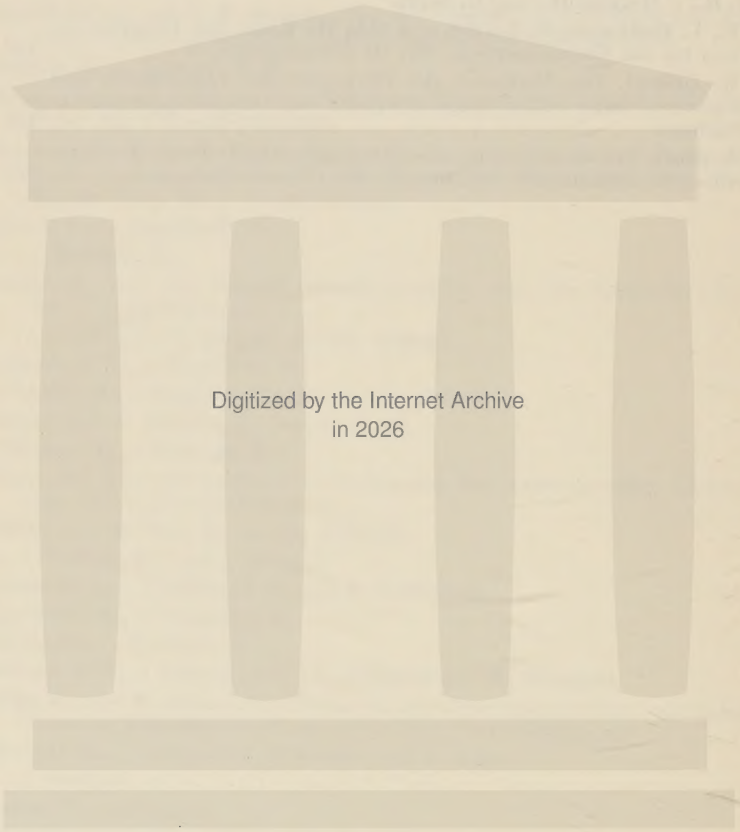
Wilhelm, G., s. **Oettel, H.**

Wilutzky, H., s. **Herken, H.,** und **G. Senft.**

Wöhler, F., L. Heilmeyer, D. Emrich und **Shin Ho Kang,** Zur Funktion des Ferritins bei der Eisenresorption. Mit 10 Textabbildungen 107

—, und **K. Ghiassi,** Das Verhalten der Glykoproteide, Lipoproteide und Serumproteide unter entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Faktoren 161

—, und **M. Körte,** Zur Beeinflussung des Eisenstoffwechsels durch Hormone, Vitamine und reduzierende Substanzen. Mit 4 Textabbildungen 502



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/naunyn-schmiedebergs-archives-of-pharmacology_1957_230

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 1—9 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Graz
(Vorstand: Prof. Dr. H. F. Häusler)

Untersuchungen über die Auslösung afferenter Impulse*

Von
F. Lembeck

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. September 1956)

Während bei Auslösung afferenter Impulse an manchen Receptororganen, wie beispielsweise den Chemoreceptoren oder den Receptoren des Jarisch-Bezold-Reflexes, die verursachten efferenten Wirkungen die Beobachtung über die Reflexauslösung ermöglichen, sind Untersuchungen über afferente Impulse aus der Haut im wesentlichen an die Beobachtung der Aktionsströme der afferenten Nerven gebunden (Brown u. Grey, 1948, Douglas u. Grey, 1953, Gollwitzer-Meier u. Witzleb, 1954). Die chemische Beeinflussung dieser Receptoren gelang hauptsächlich durch Substanzen, welche am intermediären Ganglion ausgeprägte erregende oder hemmende Wirkungen haben (Paton u. Zaimis, 1952). Doch liegt dieser Wirkung synaptotroper Substanzen in manchen Fällen, wie etwa bei den Pressoreceptoren oder den in der Haut gelegenen Schmerzreceptoren kein mit einer Synapse vergleichbares anatomisches Substrat zugrunde (Konzett u. Rothlin, 1953).

Eine von Mirzojan u. Doblatian (1956) beschriebene Methode schien geeignet, pharmakologische Einflüsse auf kutane Receptoren zu untersuchen: Das isoliert durchströmte Kaninchenohr, welches nur durch den N. auricularis mit dem Körper zusammenhängt, übermittelt auf intraarterielle Injektion geeigneter Substanzen eine reflektorische Blutdrucksenkung und Atmungssteigerung.

Mietkiewski (1956) fand diesen Reflex nach intraarterieller Injektion von 1 mg Acetylcholin, 0,1 mg Nicotin oder 1 mg Adrenalin. 1—5 mg Atropin hemmte vorübergehend die Nicotin- oder Adrenalineffekte, ebenso konnte durch Procain und andere Lokalanaesthetica eine Reflexauslösung unterdrückt werden. Der efferente Teil des Reflexes wurde nach Durchschneidung der Vagus- und Sympathicusfasern am Hals nicht unterbrochen. Mietkiewski (1956) bezeichnete die gereizten Receptoren als „Chemoreceptoren"; dies schien uns im folgenden nicht angebracht zu sein, da chemische Substanzen bekanntlich an vielen neuralen oder muskulären Elementen Erregungen auslösen und als „Chemoreceptor" doch nur jene Receptoren verstanden werden können, die in spezifischer Weise auf eine Änderung des Blutchemismus ansprechen.

* Herrn Prof. Dr. H. F. Häusler in Verehrung zum 60. Geburtstag gewidmet.

Da die Reflexauslösung von Mietkiewski (1956) nur mit verhältnismäßig hohen Dosen erzielt wurde, sollte eine Nachuntersuchung zunächst zeigen, ob solche Wirkungen auch mit wesentlich kleineren Mengen der bereits verwendeten Stoffe ausgelöst werden können.

Das besondere Interesse galt der Untersuchung von Substanz P, deren reichliches Vorkommen in dorsalen Rückenmarkswurzeln (Lembeck, 1953) bei den von Häusler angeregten Arbeiten über die zentrale Übertragung afferenter Impulse (Häusler u. Sterz, 1952) gefunden wurde. Substanz P zeigte bei den bisherigen Untersuchungen fast nur muskuläre Wirkungen (Pernow, 1953). Die eigentümliche Verteilung in einzelnen Gehirnpartien (Kopera u. Lazarini, 1953, Pernow, 1953, Zetler u. Schlosser, 1953, 1954, Amin, Crawford u. Gaddum, 1954), das reichliche Vorkommen in der Retina (Duner, Euler u. Pernow, 1954) und in bestimmten peripheren Nerven (Pernow, 1953, Amin, Crawford u. Gaddum, 1954) ließen die Annahme zu, daß die Substanz eine noch unbekannte Rolle bei der Funktion afferenter Nerven spielt. Zentrale Wirkungen konnten Euler u. Pernow (1954) bei intraventrikulärer Injektion und Zetler (1956) bei intravenöser Injektion finden. Die Methode von Mirzojan u. Doblatian (1955) und Mietkiewski (1956) schien daher besonders geeignet auch an afferenten Strukturen eine Untersuchung der Substanz P durchzuführen.

Methodik

Sie entsprach im wesentlichen den Angaben von Mietkiewski (1956), weshalb hier nur Abweichungen davon angeführt werden. Die Kaninchen wurden 3 Std vor Versuchsbeginn mit 2 g/kg Urethan (subcutan) narkotisiert. Die Atmung wurde nach der Methode von Gaddum (1941) registriert, der Blutdruck wie üblich mit einem Quecksilbermanometer aus der A. carotis. Das Ohr wurde nach Freilegung der Arterie und des N. auricularis magnus auf etwa 1,5 cm Länge zunächst mit sauerstoffgesättigter Locke-Lösung unter einem Druck von 80—90 cm Wasser durchströmt. Dann wurde an der Ohrbasis unter sorgfältiger Schonung des Nerven ein etwa 1 cm breiter Ring des Ohres herausgeschnitten und das Ohr auf eine Abtropfrinne gelagert, wobei beachtet wurde, daß keine ausfließende Perfusionsflüssigkeit zum übrigen Körper gelangen konnte. Der Durchfluß wurde mit einem Zeitkoordinatenschreiber registriert (Lembeck, 1954). Die Perfusionsflüssigkeit wurde unmittelbar vor dem Einströmen ins Ohr auf 39° C erwärmt, indem der zuleitende Polyäthylenschlauch durch ein an einen Umlaufthermostaten angeschlossenes Glasgefäß geführt wurde. Die Injektion der Substanzen erfolgte durch einen vor diesem Gefäß in den Zuleitungsschlauch eingeführten Polyäthylenschlauch von 1 mm Außendurchmesser, wodurch Temperaturschwankungen bei der Injektion vermieden werden konnten. Die Injektionsmengen betrugen 0,2 bis 0,3 ml, die in der Geschwindigkeit des Ausflusses injiziert wurden, um Druckschwankungen zu vermeiden.

Kaliumchlorid wurde in isotoner Lösung verwendet. Alle übrigen Substanzen wurden vor dem Versuch in Locke-Lösung verdünnt. Die Mengen sind jeweils auf die Base bezogen. Nicotin wurde als Bitartrat verwendet. Hydroxytryptamin als Creatininsulfat verdanken wir der Upjohn Comp., Kalamazoo, Mich., Tetramethylammoniumbromid, Tetraäthylammoniumbromid und Hexamethonium-Dihydrat den Stickstoffwerken, Linz/Donau, Adenosintriphosphorsäure der Laevosan Ges.,

Linz/Donau. Substanz P wurde nach den Angaben von Amin, Crawford u. Gaddum (1954) gereinigt, danach durch Eisessig-Ätherfällung entsalzt und durch Dialyse von Proteinen befreit. Das durch lyophile Trocknung gewonnene Präparat hatte eine Wirksamkeit von 16 E/mg. Die Präparation der Substanz P verdanken wir Herrn Dr. E. Kerschbaum, Fa. Sanabo, Wien.

Ergebnisse

1. Reflexauslösung. Sobald eine der reflexauslösenden Substanzen die Ohrgefäße erreicht hatte, kam es zu einem raschen Blutdruckabfall, der in 2—3 min wieder zur Norm zurückkehrte. Gleichzeitig mit dem

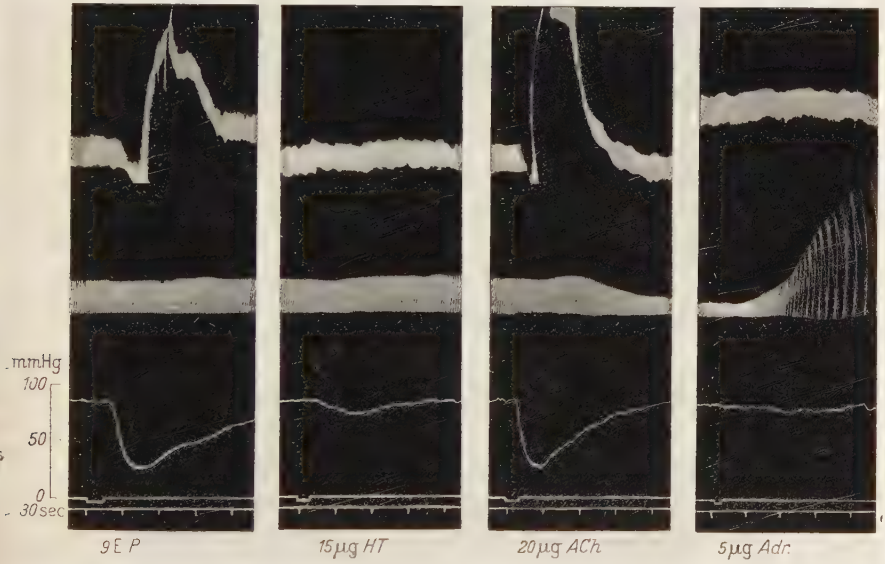


Abb. 1. Von oben nach unten: Atmung (Zunahme nach oben), Durchfluß durch das isoliert durchströmte Ohr (Vergrößerung des Ausschlages bedeutet Gefäßverengung), Blutdruck, Markierung der Injektion, Zeit 30 sec. Injektionen in das durchströmte Ohr: 9 E Substanz P; 15 µg Hydroxytryptamin; 20 µg Acetylcholin; 5 µg Adrenalin

Abfallen des Blutdruckes waren vertiefte Atemzüge zu beobachten, auf die oft eine ganz kurzdauernde Verflachung der Atmung einsetzte, nach der es erst zu einer mehrere Minuten anhaltenden vertieften Atmung kam. Dieser Wechsel der Atemzüge war bei rasch laufendem Kymographion meistens gut zu beobachten (Abb. 1). Der Reflexablauf war, wie schon Mietkiewski (1956) beschrieb, nach Durchtrennung der Vagus- und Sympathicusfasern am Hals nicht verändert. Auch die intravenöse Injektion bis zu 30 mg Atropin in den Körperkreislauf ließ keine Veränderung des Reflexablaufes erkennen. Die Auslösung des Reflexes konnte außer durch den im folgenden beschriebenen Pharmaka-Einfluß, durch Kneifen der Ohrspitze, durch elektrische Reizung des

N. auricularis und durch Aufsetzen eines Becherglases mit Wasser von 70° C erzielt werden. Manuelle Berührung oder Bewegung des Ohres hatte keinen Einfluß. Änderung des Perfusionsdruckes zwischen 105 und 35 cm Wassersäule zeigte wohl eine deutliche Änderung der Durchflußmenge, ohne aber einen Reflex auszulösen.

2. Erregung durch Pharmaka. Acetylcholin löste in Mengen von 20—30 μg, in einigen Versuchen aber auch schon mit 5 μg einen Reflex

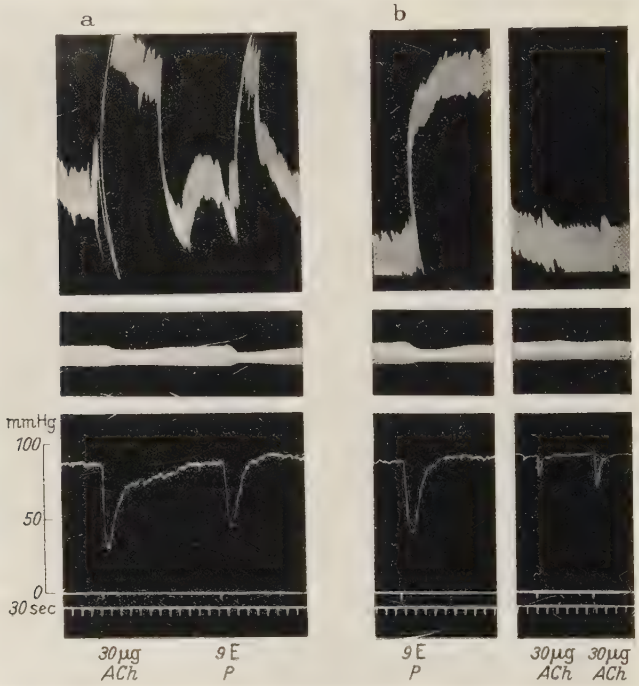


Abb. 2. Anordnung wie in Abb. 1. Zwischen *a* und *b* Injektion von 4 mg Hexamethonium in das durchströmte Ohr

aus (Abb. 1). Mit Acetylcholin konnte der Reflex bei Einhaltung von mindestens 10 min Abständen über Stunden unverändert ausgelöst werden, in einem Versuch auch noch nach 8stündiger Durchströmung bei bereits vorhandenem Ödem des Ohres. Es schien, als ob eine gewisse „Schwellendosis" notwendig sei, die dann gleich den vollen Reflex auslöste; so zeigte sich einmal bei 3 μg Acetylcholin noch nichts, bei 5 μg aber bereits ein heftiger Reflex. Auch andere synaptotrope Stoffe waren wirksam: 10—40 μg Nicotin, 20 μg Lobelin, 20 μg Tetramethylammoniumbromid. Nach Nicotin wurde bei wiederholter Injektion eine zunehmende Unempfindlichkeit und schließlich eine Lähmung beobachtet.

Tetraäthylammoniumbromid führte bei Injektion in großer Dosis (10 mg) zuerst zu einer Reflexauslösung, dann erst zur Lähmung. 20 μg Nicotin, 10 μg Lobelin riefen eine geringe, 10 mg Tetraäthylammoniumbromid eine starke Verengung der Ohrgefäße hervor. Auch die Injektion von 2 mg Kaliumchlorid hatte einen Reflex zur Folge.

Besonders auffallend war, daß es bereits auf geringe Mengen Substanz P zum Reflex kam. Meist waren 10—20 E Substanz P erforderlich, in einem Fall genügten aber auch schon 2 E Substanz P (Abb. 1).

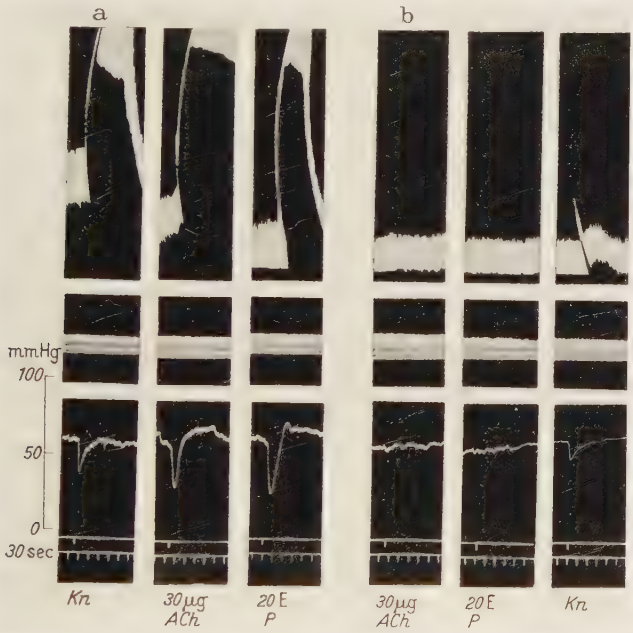


Abb. 3. Anordnung wie in Abb. 1. Zwischen *a* und *b* Injektion von 10 mg Cocain in das durchströmte Ohr. *Kn* Kneifen der Ohrspitze

3. Unwirksame Pharmaka. 40 μg Histamin und bis zu 15 μg Hydroxytryptamin zeigten keine Reflexauslösung. Nach Histamin und gelegentlich auch nach Hydroxytryptamin kam es zu einer kurzdauernden geringen Verengung der Ohrgefäße. 500 μg Adenosintriphosphorsäure waren ohne Wirkung. Schon nach 1—5 μg Adrenalin kam es zu einer langanhaltenden ausgeprägten Gefäßverengung ohne sonstigen Einfluß (Abb. 1).

4. Hemmung durch Pharmaka. Nach 10 mg Tetraäthylammoniumbromid, welches anfänglich eine Erregung auslöste, kam es zu einer Blockade der Acetylcholinwirkung; Kneifen der Ohrspitze oder Berührung des Ohres durch ein mit 70° C heißem Wasser gefüllten Becherglas

lösten aber danach noch einen Reflex aus. Nicotin führte nach wiederholter Injektion zu einer Unempfindlichkeit gegenüber Nicotin und Acetylcholin. Nach 4 mg Hexamethonium war die Wirkung von 30 µg Acetylcholin fast völlig aufgehoben, während Substanz P unverändert wirksam blieb (Abb. 2). Die Injektion von 10 mg Cocain rief eine vollkommene Hemmung der Acetylcholin- und Substanz P-Wirkung hervor, lediglich durch starkes Kneifen der Ohrspitze konnte man noch eine Reflexauslösung sehen (Abb. 3).

Die Injektion von Atropin bis zu 0,5 mg in die Durchströmungsflüssigkeit war ohne Einfluß auf die nachfolgenden Acetylcholininjektionen.

Besprechung der Ergebnisse

Die Wirkung von Substanzen auf die peripheren Endigungen von Hautnerven wurde hauptsächlich durch Ableitung der Aktionsströme dieser Nerven untersucht (Brown u. Grey, 1948, Douglas u. Grey, 1953, Gollwitzer-Meier u. Witzleb, 1954). Die Methode von Mirzojan u. Doblatian (1955) und Mietkiewski (1956) eröffnete die Möglichkeit, den durch eine periphere Reizung ausgelösten Reflex zu verwerten. Die reflektorische Blutdrucksenkung und Atmungssteigerung konnte unter geeigneten Bedingungen wiederholt und regelmäßig über Stunden ausgelöst werden. Die zur Impulsauslösung verwendeten Mengen lagen in der Größenordnung der auch andernorts bei der organnaher intraarterieller Injektion verwendeten Mengen.

Es ist unbekannt, ob am nichtnarkotisierten Tier immer derart ausgeprägte Kreislauf- und Atemreflexe auf periphere Reize hin erfolgen. In oberflächlicher Urethannarkose konnten manchmal starke Blutdruck- und Atemschwankungen bereits auf Berührung des Tieres, Umlagerung, Lärm usw. beobachtet werden. Erst in tiefer Narkose, wenn Berührung und Bewegung des Ohres oder auch des Tieres ohne jede Wirkung blieben, wurden daher die Versuche durchgeführt. Dies bedeutet, daß die injizierten Substanzen einen genügend starken Reiz ausüben müssen. Solches ist bei Acetylcholin durchaus vorstellbar, da es bei Injektion in die Armarterie bei Menschen im Vorderarmbereich heftige Schmerzen auslöst, die von Rückwirkung auf Kreislauf und Atmung sein könnten (Harvey, Lilienthal u. Talbot, 1941). Doch ist möglich, daß der Grad der Narkose eine wesentliche Beeinflussung des Reflexes bedingt.

Viele synaptotrop erregend oder hemmend wirkende Substanzen zeigen die gleichen Eigenschaften auch an afferenten Strukturen (Konzett u. Rothlin, 1953). Der Vergleich mit einer ganglionären Synapse ist in einem gewissen Grad möglich, wenn besonders differenzierte Receptorzellen vorhanden sind, wie bei den Chemoreceptoren, den Dehnungs-Receptoren des Magens (Langworthy u. Ortega, 1943) oder den Papillae foliatae (Brücke, Hellauer u. Umrath, 1948), nicht aber dort, wo die Erregung einer freien sensiblen Nervenendigung angenommen wird (Brown u. Grey, 1948, Douglas u. Grey, 1953). Auch bei den vorliegenden Versuchen am Kaninchen ist die Erregung freier Nervenenden als Schmerz-Receptoren anzunehmen (Newton, 1949).

Nach Douglas u. Grey (1953) wird durch Acetylcholin die freie Nervenendigung unmittelbar erregt und eine Übermittlung der Erregung durch Bewegungen

glatter Muskelfasern nicht für möglich gehalten, da Atropin bei Lähmung der glatten Muskelfasern die Impulsauslösung durch Acetylcholin unbeeinflußt ließ und auch die Ausschaltung der efferenten sympathischen Fasern wirkungslos war.

Da eine ganze Reihe von Substanzen eine Erregung oder Sensibilisierung verschiedenster Receptoren hervorrufen, wird eine Spezifität von Acetylcholin vielfach abgelehnt (vgl. PAINTAL, 1956). Auch KONZETT u. ROTHLIN (1953) sehen die spezifisch synaptotropen Eigenschaften einer Substanz nur als Sonderfall ihrer allgemein neurotropen Wirkungsmöglichkeit an. Es ist aber nicht zu übersehen, daß Acetylcholin vom Körper gebildet, an manchen Receptoren in hoher Konzentration gefunden wird und auch an verschiedenen Receptoren oder Nervenendigungen eine deutliche Wirkung zeigt. So besitzt das Hornhautepithel einen ungewöhnlich hohen Acetylcholingehalt, während die Trigeminusfasern nur sehr wenig Acetylcholin enthalten (BRÜCKE, HELLAUER u. UMRATH, 1949, MCINTOSH, 1941), woraus hervorgeht, daß Acetylcholin fast ausschließlich in den Epithelzellen lokalisiert ist. Die Abnahme des Acetylcholins der Hornhaut nach Trigeminusdurchtrennung (BRÜCKE, HELLAUER u. UMRATH, 1949) und die Beziehung zur relativen Hornhautsensibilität (HELLAUER 1950) weist deutlich auf eine spezifische Rolle des Acetylcholins an dieser „synapsenfreien" Stelle hin.

Die Auslösung afferenter Impulse durch Substanz P besagt noch nicht, daß der gleiche Mechanismus wie bei Acetylcholin bestehen muß. Auch am Darm bleibt bekanntlich die Substanz P-Wirkung nach Atropin erhalten. In den vorliegenden Untersuchungen löste Substanz P auch nach Hemmung der Acetylcholin-Wirkung durch Hexamethonium noch afferente Impulse aus. Vergleichbar damit wäre etwa, daß im Carotissinus nach Ausschaltung nicotinartiger Substanzen noch immer eine Reaktion auf Sauerstoffmangel vorhanden ist (DOUGLAS, 1951, 1952). Substanz P könnte demnach entweder auf die Nerven in anderer Weise als Acetylcholin oder aber über einen muskulären Angriffsort wirken, was sich mit dem vermehrten Vorkommen von Substanz P in Darmabschnitten mit starker myogener Aktivität vereinbaren ließe (PERNOW 1951, DOUGLAS, FELDBERG, PATON u. SCHACHTER, 1951). Ganglienblocker und Lokalanaesthetica können die Aktionsströme der glatten Muskelfaser und ihre Reaktion auf Streckung oder elektrotonische Durchströmung nicht beeinflussen, so daß „die glatte Muskelzelle daher die Eigenschaften eines sensorischen Organes und einer Muskelzelle in sich vereinigt" (BÜLBRING, 1955). Wenn DOUGLAS u. GREY (1954) die Mitwirkung der glatten Muskulatur bei der Impulsauslösung durch Acetylcholin ausschließen konnten, so wäre bei Substanz P doch mit dieser Möglichkeit zu rechnen.

Kaliumchlorid, das mit Ausnahme der PACINIschen Körperchen und der Deflations-Receptoren von PAINTAL (1956) fast alle nervösen oder muskulären Elemente erregt, führte auch im vorliegenden Fall zur Impulsauslösung, was den Ergebnissen von DOUGLAS u. GREY (1954) am N. saphenus entspricht.

Atropin konnte in Dosen bis zu 0,5 mg die Impulsauslösung durch Acetylcholin nicht hemmen, was DOUGLAS u. GREY (1954) ebenfalls beobachten konnten.

Mietkiewski (1956) fand eine vorübergehende Hemmung der Nicotinwirkung durch 2 mg Atropin und nahm eine lokalanaesthetische Wirkung des Atropins an, die seit den Befunden von Dews (1946) bekannt ist. Außerdem wirkt Atropin in hoher Dosis ganglienblockierend (Dutta, 1949, Konzett u. Rothlin, 1949), so daß die Hemmung erst durch diesen Effekt zustandekommen dürfte. Von einer spezifischen Hemmung durch Atropin, wie sie an den Chemoreceptoren (Landgren, Liljestrand u. Zottermann, 1952) oder an den Dehnungsreceptoren des Magens (Paintal, 1956) nachgewiesen wurde, läßt sich bei den Receptoren des Kaninchenohres nicht sprechen.

Wie am Ganglion führten Nicotin und Tetraäthylammoniumbromid erst nach anfänglicher Impulsauslösung zu einer Lähmung. Diese anfängliche Reizung der Receptoren durch Tetraäthylammoniumbromid könnte die unangenehmen Empfindungen (Kälte, Prickeln) erklären, die bei intravenöser Injektion von Tetraäthylammoniumbromid am Menschen beobachtet werden und die bei dem von vorneherein nur lähmend wirkenden Hexamethonium fehlen. Während nach Cocain jede Art von Impulsauslösung unterbrochen war, konnte man nach einem Ganglienblocker nicht von einer „lokalanaesthetischen" Wirkung sprechen, denn Kneifen oder Hitzeapplikation löste immer noch einen Reflex aus. Da der Wirkungsort von Acetylcholin und Ganglienblockern das freie Nervenende ist, kann man annehmen, daß bei den durch Ganglienblocker nicht betroffenen Erregungsvorgängen eine Beeinflussung des Nervenstammes oder ein Angriffsort peripher vom Nervenende vorliegt. Auch Gollwitzer-Meier u. Witzleb (1954) fanden am N. saphenus-Präparat nach Hexamethonium keine Hemmung der Impulsauslösung durch verschiedene Sympathicolytica. Diese Beobachtung, die bei den vorliegenden Versuchen mit Substanz P gemacht wurde, führt demnach zur Annahme, daß ihr Wirkungsmechanismus von dem der synaptotropen Substanzen völlig verschieden ist.

Summary

The perfused rabbit's ear, connected with the body only through the N. auricularis magnus, has been used to study the influence of drugs on cutaneous sensory pathways. Stimulation of these afferent fibers elicted a reflex fall of the blood pressure and a rise of the respiration.

Stimulation has been possible by injection of acetylcholine and other ganglionic excitatory substances into the ear and could be inhibited by hexamethonium, but not by atropin. Substance P leads to a stimulation of the afferent fibers which could not be inhibited by hexamethonium. Cocain inhibited all kind of peripheral stimuli.

Literatur

Amin, A. H., T. B. B. Crawford and J. H. Burn: J. of Physiol. **126**, 596 (1954). — Brown, G. L., and J. A. B. Grey: J. of Physiol. **107**, 306 (1948). — Bülbring, E.: J. of Pysiol. **128**, 200 (1955). — Brücke, H., H. Hellauer und K. Umrath: Arch. f. Physiol. **55**, 362 (1948). — Ophthalmologica (Basel) **117**, 19

(1949). — Dews, P. D.: zit. nach J. H. Burn, Background of Therapeutics, p. 93. Oxford University Press 1948. — Douglas, W. W.: J. of Physiol. **115**, 70 P (1951); **118**, 373 (1952). — Douglas, W. W., and J. A. B. Grey: J. of Physiol. **119**, 118 (1954). — Douglas, W. W., W. Feldberg, W. D. M. Paton and M. Schachter: J. of Physiol. **115**, 163 (1951). — Duner, H., U. S. Euler und B. Pernow: Acta physiol. scand. (Stockh.) **31**, 113 (1954). — Dutta, N. K.: Brit. J. Pharmacol. **4**, 197 (1949). — Euler, U. S., and B. Pernow: Nature (Lond.) **174**, 184 (1954). — Gaddum, J. H.: J. of Physiol. **99**, 257 (1941). — Gollwitzer-Meier, K., u. E. Witzleb: Pflügers Arch. **259**, 499 (1954). — Harvey, A. M., J. L. Lilienthal and S. A. Talbot: Bull. John Hopkins Hosp. **69**, 529 (1941). — Häusler, H. F., and H. Sterz: J. Mount Sinai Hosp. **19**, 121 (1952). — Hellauer, H.: Z. vergl. Physiol. **32**, 303 (1950). — Konzett, H., u. E. Rothlin: Helvet. physiol. Acta **7**, C 46 (1949). — Experientia (Basel) **9**, 405 (1953). — Kopera, H., u. W. Lazarini: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 214 (1953). — Landgren, S., G. Liljestrand u. Y. Zotterman: Acta physiol. scand. (Stockh.) **26**, 264 (1952). — Langworthy, O. R., and L. Ortega: J. Comp. Neur. **79**, 425 (1943). — Lembeck, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 197 (1953); **221**, 50 (1954). — McIntosh, F. C.: J. of Physiol. **99**, 436 (1941). — Mietkiewski, E.: Arch. internat. Pharmacodynamie **104**, 373 (1956). — Mirzojan, S. A., u. S. B. Doblatian: Farmakol. i Toksikol. **1955**, 11. — Newton, W. H.: Recent Advances in Physiol., 7. Aufl., p. 195. Philadelphia: Blakistan Comp. 1949. — Paton, W. D. M., and E. J. Zaimis: Pharmacol. Rev. **4**, 219 (1952). — Paintal, A. S.: XXth Internat. Physiol. Congr. Abstr. of Rev. p. 78 (1956). — Pernow, B.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **24**, 97 (1951); **29**, Suppl. 105 (1953). — Zetler, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 513 (1956). — Zetler, G., u. L. Schlosser: Naturwissenschaften **40**, 559 (1953).

Doz. Dr. F. Lembeck, Pharmakologisches Institut der Universität Graz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 10—13 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Laboratorium der Medizinischen Fakultät Porto
(Direktor: Prof. Dr. A. Malafaya-Baptista)

pH-Beeinflussung der Aminoxydase-Aktivität

Von

A. Malafaya-Baptista, J. Garrett, W. Osswald
und M. F. Malafaya-Baptista

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. August 1956)

In einer früheren Arbeit (Malafaya-Baptista u. Mitarb.) wurde die Möglichkeit einer Beeinflussung der Aminoxydase-Aktivität durch alkalische p_H-Werte besprochen. In der Literatur sind keine Angaben enthalten, die diese Frage klären könnten. Zwar erwähnt Hare bei der erstmaligen Beschreibung der Kaninchenleber-Aminoxydase, daß der optimale p_H-Wert der Enzym-Aktivität gegenüber Tyramin etwa p_H 10 betrage, während Kohn das Reaktionsoptimum auf p_H 7,7 verlegt; in ihrer Arbeit über die Substratspezifität der Aminoxydase kamen Alles u. Heegaard zu dem Schluß, daß ein p_H von 6,9—8,1 — je nach dem verwendeten Alkylamin — eine optimale Wirkungsbedingung darstelle. Andererseits haben Blaschko u. Hellmann festgestellt, daß mit Tryptamin inkubierte Meerschweinchen- und Ratten-Leberschnitte eine maximale Farbbildung bei p_H 7,4 aufwiesen; die Färbung war bei p_H 8,2 weniger intensiv, bei p_H 6,6 mittelstark und bei p_H 5,8 schwach. Jedoch hat keiner dieser Forscher das durch wiederholte Behandlung mit Aceton gewonnene Leberpulver — das sicher am häufigsten gebrauchte Aminoxydase-Präparat — verwendet. Diese Tatsache sowie die uneinheitlichen obengenannten Versuchsergebnisse führten zur vorliegenden Arbeit.

Methodik

Die Versuche wurden mit der üblichen manometrischen Methode (Warburg-Apparatur) durchgeführt. Nach Blaschko u. Hawkins hergestelltes Meerschweinchen-Acetontrockenpulver wurde als Enzymquelle und Tyramin als Substrat benutzt. Das Gefäß enthielt im Hauptraum 1,4 ml einer Suspension des Leberpulvers in Phosphatpuffer (28,5 mg/ml) und 0,2 ml einer neutralen 0,1 M Semicarbazidhydrochlorid-Lösung; im Einsatz 0,3 ml normaler Kalilauge; 0,4 ml einer 0,05 M-Lösung von Tyraminhydrochlorid im Seitenanhang. Sauerstoffatmosphäre, Temperatur 37,5° C. Nach eingetretenem Temperaturausgleich wurde der Inhalt des Seitenanhangs in den Hauptraum eingekippt und von diesem Zeitpunkt

an wurde der Sauerstoffverbrauch in Abständen von 15 min ermittelt; die Bebrütungszeit betrug 1 Std. Das Aminoxydase-Präparat wurde in M/15 Phosphatpuffern verschiedener p_H-Werte (5,54—11,30) suspendiert. Jede Versuchsserie schloß einen Leerversuch ein, sowie eine Kontrolle, die statt der Aminoxydase-Suspension das gleiche Volumen an Phosphatpuffer desselben p_H enthielt, so daß die Spontanoxydierung des Substrates geschätzt werden konnte.

In einer zweiten Versuchsgruppe kam als Substrat l-Adrenalin (l-Suprarenin Hoechst) in 0,025 M-Lösung zur Verwendung; die Konzentration der Aminoxydase-Suspension wurde auf 100 mg/ml erhöht.

Das p_H aller Lösungen und Suspensionen, sowie der jeweiligen Mischungen, wurde in allen Fällen elektrometrisch festgestellt.

Ergebnisse

Abb. 1 gibt eine Übersicht über die Versuchsergebnisse; auf der Abszisse wurde das p_H der Enzym-Suspension und auf der Ordinate die

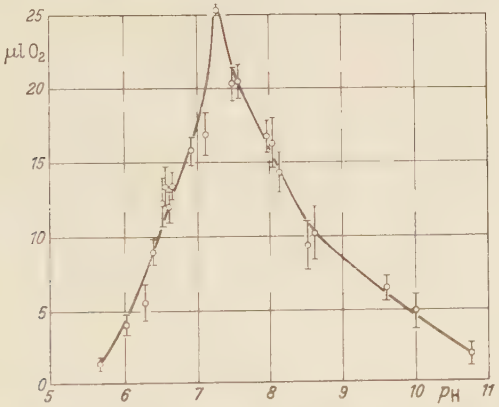


Abb. 1. Aminoxydase-Aktivität bei 30 min langer Inkubation und verschiedenem p_H (s. Text)

Sauerstoffaufnahme nach 30 min Inkubationszeit aufgetragen. Jeder angegebene Wert stellt den Durchschnitt von jeweils 5 oder 6 Einzelversuchen dar; die entsprechende Standardabweichung wird gleichfalls angegeben. Es ergibt sich, daß die maximale Wirksamkeit der Aminoxydase sich in dem schmalen p_H-Bereich von 7,10 –7,40 entfaltet, wobei die Kurvenspitze bei p_H 7,25 liegt. Geringe Änderungen des p_H können bereits nennenswerte Unterschiede in der Sauerstoffaufnahme zur Folge haben; so genügt z. B. eine Verschiebung des p_H von 7,25 auf 7,55, um den Verbrauch um 20% zu reduzieren. Die Fermentaktivität nimmt beiderseits dieses optimalen Bereiches ab, schneller jedoch auf der linken (sauren) Seite der Kurve, wie daraus zu ersehen ist, daß bei p_H 5,70 der Verbrauch fast auf Null sinkt, während das im alkalischen Bereich erst bei einem p_H von 10,80 der Fall ist.

Diese Unterschiede treten noch stärker hervor, wenn die Ergebnisse nach 60 min langer Inkubation herangezogen werden, wie aus Abb. 2 hervorgeht, in der die Sauerstoffaufnahme (nach 15, 30, 45 u. 60 min) für einige repräsentative Beispiele angegeben ist.

Kommt Adrenalin als Substrat zur Verwendung, so verläuft die Kurve des O_2-Verbrauches im sauren Bereich der für Tyramin beschriebenen ziemlich parallel; für p_H-Werte höher als 7,50 nimmt die Spontanoxydation dermaßen zu, daß eine genaue Bewertung der Ergebnisse überhaupt nicht mehr möglich ist.

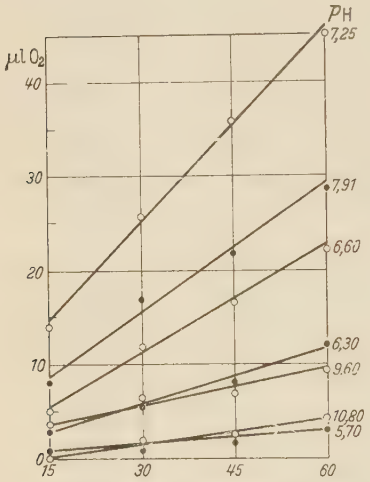


Abb. 2. Aminoxydase-Aktivität bei länger dauernder Inkubation und verschiedenem p_H (s. Text)

Schließlich sei noch erwähnt, daß das p_H der Aminoxydase-Suspension nicht mit dem der jeweils entsprechenden Pufferlösung identisch ist; in Wirklichkeit erfährt das p_H der mit Puffern von p_H 7,80—8,00 vorbereiteten Suspensionen kaum eine nennenswerte Änderung, für p_H-Werte unter 7,80 zeigt aber die Suspension ein höheres p_H auf als die entsprechende Pufferlösung, während für p_H-Werte über 8,00 ein entgegengesetztes Verhalten festzustellen ist. Diese p_H-Verschiebungen sind bei Verwendung von Puffern mit extremen Werten ausgesprochener und werden sogar nach mehrfachem Auswaschen beobachtet. Höhere Acetontrockenpulver-Konzentrationen (Versuche mit Adrenalin als Substrat) führen zu noch stärkeren Verschiebungen des Puffer-p_H.

Die mit einer Pufferlösung von p_H 7,10—7,20 vorbereitete Suspension zeichnet sich durch optimale Bedingungen für den enzymatischen Abbau von Tyramin aus; der Gebrauch eines Puffers von p_H 7,40 führt, obwohl weitverbreitet, zu einer Suspension von p_H 7,47, d. h. zu einem submaximalen O_2-Verbrauch.

Aus diesen Versuchsergebnissen wird gefolgert, daß dem Einfluß geringer p_H-Änderungen auf die Aminoxydase-Aktivität größere Beachtung geschenkt werden sollte, vor allem in den Versuchen, in denen ein Hemmeffekt bestimmter Pharmaka beobachtet wird: es ist daher erforderlich, daß die entsprechenden Puffer derart gewählt werden, daß sie eine Einheitlichkeit des p_H in den Versuchsgefäßen *und* in den Kontrollgefäßen gewährleisten. Offenbar ist diese methodische Vorsichtsmaßnahme notwendig, um irreführende Ergebnisse zu vermeiden, die durch ungünstige Verhältnisse für die fermentative Kinetik — infolge eventueller Verschiebungen der H^+-Konzentration — bedingt werden können.

Summary

pH variations greatly influence the activity of guinea pig liver aminoxidase; the maximum of oxidative deamination takes place in the range from 7,10 to 7,40, when tyramin is used as a substrate.

Literatur

Alles, G. A., and E. V. Heegaard: J. of Biol. Chem. **147**, 487 (1943). — Blaschko, H., and J. Hawkins: Brit. J. Pharmacol. **5**, 625 (1950). – Blaschko, H., and K. Hellmann: J. of Physiol. **122**, 419 (1953). — Hare, M. L. C.: Biochemic. J. **22**, 968 (1928). — Kohn, H. I.: Biochemic. J. **31**, 1693 (1937). — Malafaya-Baptista, A., J. A. Guimarãis, J. Garrett und W. Osswald: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 243 (1955).

Prof. Dr. A. Malafaya-Baptista, Laboratório de Farmacologia,
Faculdade de Medicina do Pôrto, Portugal

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, 14—25 (1957)

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der Nordmark-Werke G. m. b. H. Hamburg
Werk Uetersen/Holstein

Das Verhalten der Elektrolyte in Blut, Muskel und Gehirn unter der Wirkung von Analepticis

Von
G. Stille und H. Kröger

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. September 1956)

Die vorliegende Arbeit befaßt sich neben bekannten Analepticis mit dem 1-(p-Methoxyphenyl)-pentyl-3-amin, einem Krampfgift, das unter der Werkbezeichnung DO 601 geprüft wurde.

DO 601 führt bei i.v. Injektion an Mäusen in einer Dosis von 6 mg/kg bei 50% der Tiere zum tonischen Streckkrampf und Tod. Bei fraktionierten i.v. Gaben vermag DO 601 nach unseren Untersuchungen die Letalität bei Verabreichung tödlicher Dosen von Barbital[1] von 100 auf 25% zu senken (Stille).

Besonders bemerkenswert erschien uns die intensive lokalanaesthetische Wirksamkeit von DO 601 im Meerschweinchen-Quaddelversuch, die später auch für Pikrotoxin, Pentetrazol[2] und Nikäthamid[3] nachgewiesen werden konnte (Stille). Diese Beobachtung ließ daran denken, daß den Substanzen eine Wirkung auf die Zellgrenzfläche und auf die Elektrolyt-Verteilung zwischen Zellinnerem und extracellulärem Raum zu eigen wäre, wobei wir uns auf die Vorstellungen von Shanes u. Fleckenstein stützen. Zur Klärung dieser Frage bedienten wir uns zunächst der von Hardt u. Fleckenstein beschriebenen Versuchsanordnung. Da die hierbei erforderlichen Dosen so hoch lagen, daß die Versuche keine allgemeinen Aussagen über die Wirkung der vorliegenden Stoffe gestatteten, untersuchten wir ferner den Einfluß der Analeptica auf

1. den Kaliumgehalt des zu- und abfließenden Gehirnblutes beim Kaninchen ohne und mit Curarisierung,

2. die Verteilung von Kalium, Natrium und Chlor in Gehirn und Blut (extra- und intracellulär),

3. die Krampfwirkung des Procains.

[1] Ph. I., Veronal, Wz. der Farbenfabriken Bayer.
[2] Ph. I., Cardiazol, Wz. der Knoll A.G.
[3] Ph. I., Coramin, Wz. der Ciba A. G.

Methode

Die Wirkung der Analeptica auf den Froschrectus wurde nach der von HARDT u. FLECKENSTEIN angegebenen Methode untersucht. Die unter der Wirkung der Prüfsubstanzen in 15 min vom Muskel in der Badeflüssigkeit (0,6% NaCl) freigesetzte Kaliummenge wurde flammenphotometrisch bestimmt (Fa. Zeiss, Spektrophotometer mit Monochromator M4Q und Flammenphotometerzusatz).

Frisch präparierte Mm. recti abd. von Winterfröschen wurden 30 min in eine 0,6%ige NaCl-Lösung evtl. unter Zusatz der jeweiligen Prüfsubstanz gebracht. Darauf wurde der Muskel an den mittleren Inscriptiones angeschnitten und das Verletzungspotential gemessen.

Ferner wurde das Verletzungspotential in Anlehnung an ROTHSCHUH u. BOGATZKI an den Mm. recti, Mm. sartorii und Adductoren von Fröschen in situ untersucht. Die Messung erfolgte 15 min nach Injektion der Prüfsubstanz in den Brustlymphsack. Tötung durch Decapitation.

Wir bedienten uns zur Potentialmessung eines p_H-Meßgerätes der Fa. Philips (G. M. 4494), und zwar wurde an zwei Calomelelektroden ein in 0,6%ige Kochsalzlösung getränkter Wollfaden befestigt, der Wollfaden der einen Elektrode mit der Schnittfläche, der andere mit der Oberfläche des Muskels in Kontakt gebracht. Die Angaben beziehen sich auf Mittelwerte mit mittlerer Abweichung.

Bei Bestimmung der arterio-venösen Differenz der Kaliumwerte im Hirnblut gingen wir folgendermaßen vor: Bei Kaninchen in Numalnarkose[1] (90 mg/kg) führten wir in die linke Arteria femoralis eine Kanüle und in die linke Vena jugularis interna einen Polyäthylenkatheter ein. In bestimmten Zeitabständen wurden gleichzeitig 2 ml Blut aus beiden Gefäßen entnommen und der Kaliumspiegel flammenphotometrisch bestimmt (Verdünnung 1 : 10 mit Aqua dest.).

DO 601 wurde in der jeweiligen Menge in eine Ohrvene verabreicht. Zur Bestimmung des Blutkaliumspiegels unter Curarisierung infundierten wir zusätzlich eine 0,01%ige d-Tubocurarin-Lösung mit Hilfe einer Infusionspumpe in die Ohrvene (1 ml/3,45 min).

Bei der Durchführung der Versuche am Kaninchen waren wir uns bewußt, daß allein durch die Blutabnahme eine Hyperkaliämie ausgelöst werden kann (D'SILVA). In Parallelversuchen konnten wir jedoch zeigen, daß unter unseren Bedingungen die Blutentnahme keinen Einfluß auf das Versuchsergebnis hat.

Ratten erhielten 10 mg/kg DO 601 bzw. 50 mg/kg Pentetrazol i.v. verabreicht und wurden im Krampf entblutet, das Gehirn möglichst schonend entnommen und die Elektrolyte folgendermaßen bestimmt:

Das Serum wurde zur Ermittlung des Kaliums mit Flammenphotometer (s. oben) 1 : 10, des Natriums 1 : 100 mit Aqua dest. verdünnt.

Zur Ermittlung der Chlorwerte bedienten wir uns der von VAN SLYKE angegebenen Methode: 1 ml Serum wurde in einem Erlenmeyer-Kolben (Inhalt 50 ml) mit 3 ml einer Lösung von 0,05 n-Silbernitrat in konzentrierter Salpetersäure versetzt und 3 Std auf einem siedenden Wasserbad belassen. Daraufhin wurden 6 ml Wasser und 6 ml 5%iges Eisenammonium-sulfat zugegeben und die erkaltete Lösung mit 0,05 n-Ammoniumrhodanid titriert.

Das Gehirn wurde im Homogenisator der Firma Braun (Melsungen) zerkleinert und im Verhältnis 1 : 10 mit Aqua dest. versetzt. Zur Bestimmung des Kaliums und Natriums verdünnten wir weiter, so daß die Endverdünnung 1 : 100 betrug. Die flammenphotometrische Bestimmung erfolgte dann in gleicher Weise wie beim Serum.

[1] Wz. der Hoffmann la Roche A.G.

Zur Ermittlung des Chlors versetzten wir 2 ml des 1 : 10 verdünnten Gehirnhomogenats mit 5 ml der Silbernitrat-Salpetersäure-Lösung.

Der Wassergehalt wurde durch 24stündige Trocknung einer eingewogenen Gehirnmenge bei 105° C bestimmt.

Bei der rechnerischen Ermittlung von Chlorraum und intra- und extracellulärem Natrium und Kalium bedienten wir uns der von Cotlove u. Kühns angegebenen Formeln. Wir sind uns bewußt, daß diese für das Gehirn nur mit gewissen Einschränkungen Gültigkeit haben, da der Liquorraum unberücksichtigt bleibt. Auch Woodbury hat in seinen umfangreichen Arbeiten zur Errechnung der entsprechenden Werte für das Gehirn die von Cotlove entwickelten Formeln benutzt, und für vergleichende pharmakologische Untersuchungen dürfte diese auch ausreichende Sicherheit bieten.

Eine weitere Unsicherheit liegt im Begriff des Chlorraumes und seiner Gleichsetzung mit dem extracellulären Raum. Wir verweisen in diesem Zusammenhang auf die Arbeiten von Fenn, Eggleton, Eggleton u. Hamilton; Boyle u. Conway und Boyle, Conway, Kane u. O'Relly.

Alle unsere Angaben erfolgen in mÄquiv./Liter bzw. in mÄquiv./kg Feuchtgewicht mit den mittleren Fehlern, bzw. für den Chlorraum und den Wassergehalt in g/kg Feuchtgewicht. Die Natrium- bzw. Kaliumquotienten ergeben sich aus

$$\frac{\text{Na extracell.}}{\text{Na intracell.}} \text{ und } \frac{\text{K intracell.}}{\text{K extracell.}}$$

Die Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Testes nach Student ermittelt.

Es wurden nüchterne Mäuse im Gewicht von 20 g verwendet. Procain wurde mit DO 601 oder Pentetrazol in der Mischspritze i.v. verabreicht. Wegen des verzögerten Auftretens der Krämpfe beim Nikäthamid und Pikrotoxin wurde hier das Procain 4—5 min nach Verabreichung der Krampfgifte i.v. injiziert.

Ergebnisse

1. Die Wirkung von Analepticis auf den Froschmuskel

Bei allen untersuchten Analepticis zeigte sich eine deutliche Kontrakturwirkung auf den isolierten M. rectus abd. des Frosches (Tab. 1). Die Kontrakturen unterscheiden sich von der nach Acetylcholin durch einen flacheren Anstieg. Die Wirkung ist in jedem Fall auswaschbar und der Muskel bleibt durch Acetylcholin voll erregbar. Es scheint also eine echte Erregungskontraktur und trotz der verwendeten hohen Konzentrationen keine Schädigung des contractilen Systems vorzuliegen. Bemerkenswert erscheint uns, daß die Kontrakturwirkung der Analeptica auf den Froschmuskel im Gegensatz zur Acetylcholinwirkung durch N-Methyl-Cyclohexenyl-Methylbarbitursäure[1] nicht gehemmt wird. Bis auf Pikrotoxin läßt sich die Wirkung aller Krampfgifte durch Vorbehandlung mit Procain deutlich abschwächen.

In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigt sich unter der Wirkung der Analeptica eine Senkung des Verletzungspotentials an Froschmuskeln in situ (Tab. 2) und am isolierten M. rectus abd. (Tab. 3).

[1] Evipan, Wz. der Farbenfabriken Bayer.

Nach Boyle u. Conway stimmt das Verletzungspotential unter den von ihnen verwandten Bedingungen (modifizierte Barkanlösung, Durchperlung mit 95% O_2 und 5% CO_2) erstaunlich genau mit dem theoretisch errechneten Donnanpotential

Tabelle 1. *Kaliumabgabe und Kontrakturhöhe nach Einwirkung von Analepticis auf den M.rectus abd. von Rana temporaria*
Die Kontrakturhöhe stellt den realen Wert unter Berücksichtigung der Hebelübersetzung dar. Kontrakturhöhe und Kaliumausschüttung sind in Mittelwerten von 20 Einzelversuchen (mit mittlerer Abweichung) verzeichnet

Kontrakturstoff	Vorbehandlung für 30 min	Kaliumabgabe (in γ)	Kaliumabgabe (in mÄquiv. pro kg Muskel)	Kontrakturhöhe (in mm)
Acetylcholin ($1 \cdot 10^{-6}$)	—	$182 \pm 33{,}8$	$9{,}4 \pm 2{,}2$	$6{,}9 \pm 3{,}9$
	N-Methylcyclohexenylmethylbarbitursäure ($2{,}5 \cdot 10^{-3}$)	$117 \pm 26{,}6$	$7{,}4 \pm 1{,}7$	$2{,}7 \pm 1{,}3$
	N-Methylcyclohexenylmethylbarbitursäure ($2{,}5 \cdot 10^{-3}$) und DO 601 ($1 \cdot 10^{-3}$)	$257 \pm 58{,}3$	$16{,}5 \pm 4{,}9$	$7{,}6 \pm 1{,}1$
DO 601 ($1 \cdot 10^{-3}$)	—	$168 \pm 40{,}2$	$10{,}3 \pm 1{,}9$	$9{,}6 \pm 2{,}9$
	N-Methylcyclohexenylmethylbarbitursäure ($2{,}5 \ 10^{-3}$)	180 ± 20	$13{,}0 \pm 1{,}6$	$10{,}5 \pm 1{,}7$
	Procain ($1 \cdot 10^{-2}$)	$165 \pm 42{,}5$	$8{,}6 \pm 1{,}9$	$3{,}6 \pm 1{,}3$
Pentetrazol ($1 \cdot 10^{-2}$)	—	240 ± 40	$15{,}2 \pm 3{,}2$	$8{,}9 \pm 2{,}7$
	Procain ($1 \cdot 10^{-2}$)	$162 \pm 27{,}8$	$11{,}3 \pm 1{,}9$	$5{,}0 \pm 1{,}1$
Nikäthamid ($2 \cdot 10^{-2}$)	—	$180 \pm 65{,}0$	$11{,}9 \pm 3{,}8$	$9{,}1 \pm 1{,}3$
	Procain ($1 \cdot 10^{-2}$)	$94 \pm 15{,}9$	$7{,}1 \pm 1{,}88$	$4{,}2 \pm 0{,}8$
Pikrotoxin ($2{,}5 \cdot 10^{-3}$)	—	$150 \pm 22{,}6$	$11{,}4 \pm 1{,}7$	$5{,}5 \pm 0{,}5$
	Procain ($1 \cdot 10^{-2}$)	$140 \pm 43{,}1$	$12{,}5 \pm 3{,}8$	$4{,}8 \pm 1{,}1$

Tabelle 2. *Verletzungspotential verschiedener Muskeln von Rana temporaria in situ*

	Verletzungspotential (in mVolt)			Zahl der Messungen
	M. sartorius	M. rectus	Adductoren-Gruppe	
unbehandelt	$61 \pm 5{,}3$	$35 \pm 5{,}4$	$55 \pm 5{,}4$	20
DO 601 200 mg/kg	$43 \pm 8{,}1$	$16 \pm 6{,}2$	$33 \pm 6{,}2$	18
Pentetrazol 500 mg/kg	$46 \pm 12{,}3$	$30 \pm 8{,}6$	$45 \pm 7{,}4$	18
Nikäthamid 2250 mg/kg	$40 \pm 11{,}1$	$13 \pm 3{,}9$	$38 \pm 7{,}1$	16
Pikrotoxin 50 mg/kg	$44 \pm 7{,}9$	$19 \pm 4{,}4$	$41 \pm 8{,}2$	16

der Zelle überein. Offenbar liegen nach Untersuchungen der genannten Autoren keine Kurzschlüsse durch extracelluläre Elektrolyte vor. Rothschuh u. Bogatzki betonen, daß sich ein relatives Maß für die Höhe der Membranspannung durch die Messung des Verletzungspotentials gewinnen läßt, soweit durch die Eingriffe eine Veränderung der Widerstandsverhältnisse nicht zu erwarten ist.

Tabelle 3. *Verletzungspotential des M. rectus abd. von Rana temporaria in vitro*

	Verletzungspotential (in mVolt)	Zahl der Messungen
unbehandelt	$22 \pm 4{,}9$	46
DO 601 ($1 \cdot 10^{-3}$)	$19 \pm 3{,}3$	33
DO 601 ($5 \cdot 10^{-3}$)	$12 \pm 4{,}3$	10
DO 601 ($1 \cdot 10^{-2}$)	$6{,}3 \pm 3{,}5$	10
Pentetrazol ($1 \cdot 10^{-2}$)	$19 \pm 6{,}0$	12

In unseren Versuchen konnten Verletzungspotentiale in der nach Boyle u. Conway theoretisch zu erwartenden Höhe annähernd nur am M. sartorius und den Adductoren des unbehandelten Frosches in situ gemessen werden. Am Froschrectus waren die Potentiale sowohl in vitro als in situ erheblich niedriger. Für die isolierten Muskeln verwendeten wir eine modifizierte Barkanlösung oder in Anlehnung an Hardt u. Fleckenstein eine NaCl-Lösung als Badeflüssigkeit, und zwar ohne Sauerstoffdurchperlung. Unter diesen Bedingungen muß bereits eine Membranschädigung als wahrscheinlich gelten (Boyle u. Conway).

2. Der Kaliumgealt des Blutes beim Kaninchen ohne und mit Curarisierung

Wie die Kurven in Abb. 1 zeigen, kommt es bei mit Numal narkotisierten Kaninchen nach i.v. Injektion von DO 601 zu einem Anstieg der Serum-Kalium-Werte, und zwar immer erst mit Eintritt von peripheren Krampferscheinungen. Wir beobachteten Kalium-Werte bis zu 70 mg-%, wobei die Tiere allerdings ad exitum kamen (Kaninchen A und B in Abb. 1). Überleben die Tiere den Krampf (Kaninchen C in Abb. 1), so geht der Kaliumspiegel in 15—20 min auf den Ausgangswert zurück. Das Maximum der Kalium-Werte liegt etwa 10—15 min nach Einsetzen der bei den narkotisierten Tieren vorwiegend klonischen Krämpfe. Die Latenz von der Injektion des Krampfgiftes bis zum Krampf ist sehr verschieden und schwankt wie die zur Auslösung des Krampfes erforderliche Dosis offenbar mit der Narkosetiefe des jeweiligen Versuchstieres.

Ein nennenswerter Unterschied im Kaliumgehalt des gleichzeitig entnommenen arteriellen und Hirnvenenblutes ist nicht festzustellen. Offenbar ist das Gehirn nur zu einem bei der Bestimmung nicht ins Gewicht fallenden Anteil an der Kaliumfreisetzung beteiligt.

Eine deutliche Abhängigkeit dagegen besteht zwischen der Stärke der Krämpfe und dem Ausmaß des Anstieges der Serum-Kalium-Werte.

Für die Bedeutung der krampfenden Muskulatur beim Anstieg des Serum-Kalium-Spiegels sprechen auch Versuche am curarisierten Tier,

von denen 3 in Abb. 2 dargestellt werden. Trotz wiederholter Gaben von DO 601 und Gesamtdosen bis zu 30 mg/kg bleibt beim curarisierten Kaninchen mit den Krämpfen auch die Hyperkaliämie aus.

3. Die Verteilung von Kalium, Natrium und Chlor in Gehirn und Blut

Die Analysenergebnisse der Cl-, Na- und K-Werte in Serum und Gehirn wurden in Tab. 4 zusammengefaßt.

Nach Pentetrazol kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Serum-Chlors, während beim DO 601 zwar auch eine Zunahme vorhanden ist, die jedoch nicht als gesichert gelten kann. Offenbar liegt ein Abstrom von Chlor-Ionen aus dem Gehirn vor, denn insbesondere bei den mit DO 601 behandelten Tieren sinkt der Cl-Gehalt des Gehirns. Die Differenz zu den Kontrollen ist beim Pentetrazol nicht gesichert.

Die Serum-Natrium-Werte zeigen unter der Wirkung der Analeptica keine Veränderung. Dagegen kommt es zu einer ausgeprägten Hyperkaliämie, die der Kaliumausschüttung aus der krampfenden Muskulatur (s. oben) und, — wenn auch nur zum verschwindenden Teil —, einem deutlichen Kaliumverlust des Gehirns zuzuschreiben ist.

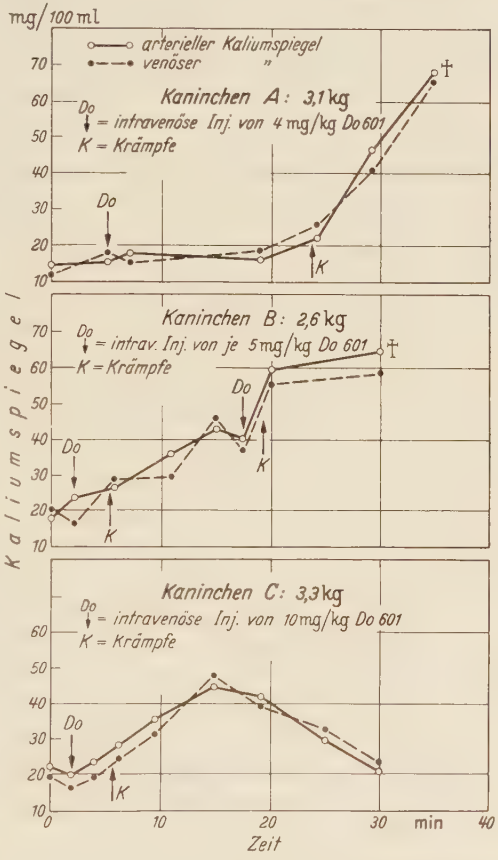


Abb. 1. Kaliumspiegel des Blutes nach Injektion von DO 601-Lösung. o——o arterieller Kaliumspiegel; •——• venöser Kaliumspiegel

Insbesondere bei den mit DO 601 behandelten Tieren kommt es zu einer erheblichen Abnahme des Chlorraumes im Gehirn, was bei dem für alle Gruppen gleichen H_2O-Gehalt für einen Abstrom des extracellulären Wassers in die Zelle sprechen würde. Die geringe Senkung der Gehirn-Natrium Werte unter der Wirkung der Analeptica, vor allen Dingen nach DO 601, dürfte mit der Abnahme des Chlorraumes in Beziehung

stehen. Die Abnahme des Natriumraumes ist geringer als die des Chlorraumes.

Von den Elektrolytverschiebungen zwischen Zelle und extracellulärem Raum sind sowohl nach Injektion von DO 601 als auch nach Pentetrazol der Abstrom von Kalium aus der Zelle und die damit verknüpfte Senkung des Kalium-Quotienten am auffälligsten. Ein Einstrom von Natrium in die Zelle ist nur bei den mit DO 601 behandelten Tieren statistisch gesichert und erklärt auch die relativ geringere Abnahme des Natriumraumes gegenüber der des Chlorraumes im Gehirn.

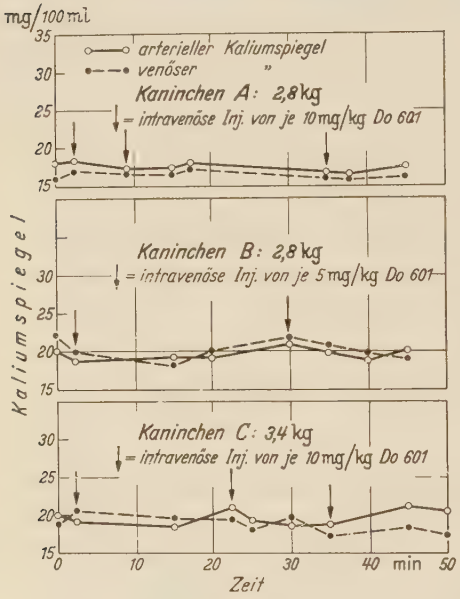


Abb. 2. Kaliumspiegel des Blutes nach Injektion von DO 601 Lösung unter gleichzeitiger Infusion d-Tubocurarin-Lösung. o——o arterieller Kaliumspiegel; •——• venöser Kaliumspiegel. Curare Zufuhr: 1 ml/3,45 min einer 0,01%igen Lösung von d-Tubocurarin

4. Die Beeinflussung der Analepticum-Wirkung durch Procain

Wie Tab. 5 zeigt, wird durch Procain in einer Dosis von 30 mg/kg die Zahl der mit einem tonischen Streckkrampf auf die entsprechende Dosis von DO 601 reagierenden Tiere und die Letalität von 95 auf 10% herabgesetzt. Bei Kombination mit Pentetrazol beeinflußt Procain zwar das Krampfbild, aber nur unwesentlich die Letalität. 20 mg/kg Procain verhindern fast völlig das Auftreten des tonischen Streckkrampfes nach Pentetrazol. Dafür kommt es zum Auftreten anhaltender klonischer Krämpfe, die mit dem Tod der Tiere enden. Auch beim Pikrotoxin und Nikäthamid bewirkt Procain eine deutliche Hemmung des tonischen Streckkrampfes, während die Letalität nicht eindeutig beeinflußt wird.

Diskussion

Die Kontrakturwirkung der untersuchten Analeptica auf den Froschmuskel, die damit einhergehende Kaliumausschüttung und die beobachtete Senkung des Verletzungspotentials sprechen, zumindest in den verwendeten hohen Dosen, für eine Wirkung auf die Zellgrenzflächen.

Die vorliegenden Untersuchungen sind also eine Bestätigung der von Hofmann an Hand der Wechselstrompolarisationskapazität (Froschhaut und Froschmuskel)

gemachten Beobachtungen, die gezeigt haben, daß bei den Analepticis drei Wirkungsphasen an der Grenzfläche zu beobachten sind:

1. die reversible Permeabilitätssteigerung,
2. die reversible Permeabilitätsverminderung und
3. die irreversible Permeabilitätssteigerung.

Besonders auffällig ist aber hierbei die in einem breiten Konzentrationsbereich nachweisbare Permeabilitätssteigerung, und Hofmann erscheint es „bestechend, die Phase der reversiblen Durchlässigkeitssteigerung als Ausdruck der erregenden Wirkung der Analeptica zu deuten". Hierfür spricht, daß die durch Narkotica reversible verminderte Grenzflächendurchlässigkeit durch die Wirkung eines Analepticums gesteigert wird. Nach diesen Arbeiten war die von uns beobachtete Senkung des Verletzungspotentials am Froschmuskel, die einhergeht mit Kaliumverlust der Zellen, durchaus zu erwarten.

Besonders bemerkenswert erscheint uns, daß die kontrakturerzeugende Wirkung von DO 601, Pentetrazol und Nikäthamid am Froschrectus durch Vorbehandlung mit Procain herabgesetzt wird. Die genannten Analeptica verhalten sich also in dieser Hinsicht ähnlich wie Acetylcholin und andere Kontrakturstoffe (Hardt u. Fleckenstein), insbesondere das Veratrin (Schüller u. Athmer) und das kürzlich von Zipf, Kreppel u. Wetzels als „Katelektrotonikum" bezeichnete DO R 9/R 3 (Soehring, Dass u. Stave).

Auf Grund der zitierten Arbeiten und unserer eigenen Versuchsergebnisse glauben wir zu der Annahme berechtigt zu sein, daß die geprüften Analeptica eine depolarisierende Wirkung haben und damit zumindest in ihrer Wirkung am Muskel in die Gruppe der „Katelektrotonika" eingeordnet werden können, wobei allerdings noch Unterschiede zwischen den verwendeten Analepticis bestehen. Wieweit dieser Eigenschaft für die Wirkungen der Krampfgifte am ZNS Bedeutung zukommt, insbesondere im Hinblick auf die in den vorliegenden Versuchen verwendeten hohen Analepticumkonzentrationen, bleibt zu klären.

Am auffallendsten war sowohl bei Kaninchen als bei Ratten eine deutliche Hyperkaliämie unter der Wirkung krampferzeugender Dosen von DO 601 und Pentetrazol, die auch bereits anderweitig beschrieben wurde (Cicardo, Horwitt, Steinberg u. Liebert; Moglia u. Cardini; Meyer u. Walter). Es gelang uns jedoch zu keinem Zeitpunkt der Analepticumwirkung, einen sicheren Anstieg der arteriovenösen Differenz der Serum-Kalium-Werte zwischen zu- und abfließendem Gehirnblut beim Kaninchen festzustellen. Wir glauben daher annehmen zu müssen, daß die Hyperkaliämie im wesentlichen die Folge einer Kaliumausschüttung aus der krampfenden Muskulatur ist, zumal sie bei Curarisierung der Versuchstiere nicht auftritt. Wie aus der Abb. 1 hervorgeht, können die Serum-Kalium-Werte auf bedrohliche Höhe ansteigen, wobei die für die Hyperkaliämie typischen EKG-Veränderungen zu beobachten waren (Stille u. Kröger). Wie die Gehirn-Kalium-Werte

Tabelle 4

	Tierzahl	Serum (mÄquiv./l)			Gehirn											
					mÄquiv./kg Feuchtgewicht			Cl-Raum g/kg Feuchtgewicht	H_2O-Gehalt g/kg Feuchtgewicht	Natrium (mÄquiv./kg Feuchtgewicht)			Kalium (mÄquiv./kg Feuchtgewicht)		
		Cl	Na	K	Cl	Na	K			intracell.	extracell.	Na-Quot.	intracell.	extracell.	K-Quot.
unbehandelt	10	94,1 ± 0,79	146,3 ± 1,02	9,1 ± 0,17	28,3 ± 0,24	47,2 ± 0,53	82,4 ± 4,2	288,7 ± 8,3	789,3 ± 0,94	6,9 ± 1,54	40,3 ± 1,13	13,2 ± 4,41	79,9 ± 4,23	2,5 ± 0,1	32,8 ± 2,58
10 mg/kg Do 601 i.v.	11	96,5 ± 1,06	143,5 ± 2,75	11,5 ± 0,19	25,3 ± 0,96	44,8 ± 0,88	67,6 ± 2,22	253,3 ± 9,17	792,3 ± 4,5	10,2 ± 1,33	34,6 ± 1,62	4,9 ± 1,44	64,8 ± 2,15	2,9 ± 0,12	22,8 ± 0,78
50 mg/kg Pentetrazol i.v.	10	98,7 ± 0,93	146,0 ± 1,32	11,3 ± 0,25	27,2 ± 0,65	45,0 ± 0,74	67,1 ± 1,19	274,9 ± 5,94	787,3 ± 0,73	6,9 ± 1,03	38,2 ± 0,99	8,0 ± 1,93	64,1 ± 1,14	3,0 ± 0,12	21,9 ± 0,76

zeigen, kommt es allerdings doch, sowohl nach DO 601 als nach Pentetrazol, zu einem deutlichen Kalium-Verlust des Gehirns, der allerdings für das gesamte Rattengehirn nur etwa 0,017 mÄqu. beträgt, offenbar also im Verhältnis zum Kalium-Verlust der Muskulatur sehr gering ist; er fällt deshalb wohl bei Ermittlung der arteriovenösen Differenz in die Grenzen des Bestimmungsfehlers.

Eine Abnahme der Kaliumwerte in den corticalen Neuronen nach Pentetrazol fanden ebenfalls Colfer u. Essex. Allerdings konnten wir die Beobachtung der genannten Autoren, daß das Natrium zunimmt, für das Rattengehirn nicht bestätigen; im Gegenteil sind unsere Gehirn-Na-Werte im Krampf zumindest nach DO 601 ebenfalls signifikant herabgesetzt.

Die deutliche Abnahme des Chlorraumes unter dem Krampf dürfte in Anbetracht des gleichbleibenden Wassergehaltes des Gehirns auf eine Vermehrung des intracellulären Wassers zurückzuführen sein. Dabei kommt es wohl zum Abstrom von Chlorid in das Blut.

Besondere Bedeutung messen wir den auftretenden Verschiebungen der Elektrolyte zwischen extra- und intracellulärem Raum bei. Mit der sowohl beim DO 601 als — wenn auch schwächer und

statistisch nicht gesichert — beim Pentetrazol zu beobachtenden Natriumverarmung des extracellulären Raumes geht beim DO 601 eine deutliche Zunahme des Natriumgehaltes der Zelle einher, also in jedem Fall eine erhebliche Abnahme des Na-Quotienten. Umgekehrt kommt es nach beiden Analepticis zu einem ausgesprochenen K-Verlust der Zelle und damit zur Senkung des K-Quotienten. Die K-Bewegung ist also die gleiche wie am Froschmuskel unter der Wirkung von Analepticis.

Tabelle 5. *Wirkung von Procain auf Streckkrampf und Letalität von Mäusen nach Do 601, Pentetrazol Pikrotoxin und Nikäthamid*

Krampfgift	Dosis mg/kg	Procain mg/kg	Gesamtzahl der Mäuse	Zahl der Toten	%	Zahl der Streckkrämpfe	%	
Do 601	7,0	—	30	24	80	24	80	
		5	10	4	40	4	40	
		10	10	2	20	1	10	
		20	10	1	10	0	0	
	7,5	—	20	19	95	19	95	
		5	10	6	60	6	60	
		10	10	6	60	6	60	
		20	10	6	60	6	60	
		30	10	1	10	1	10	
Pentetrazol	90	—	10	9	90	9	90	anhaltende
		5	10	8	80	4	40	klonische
		10	10	7	70	1	10	Krämpfe
		20	10	10	100	1	10	
Pikrotoxin	4,8	—	10	9	90	9	90	anhaltende
		30	10	10	100	0	0	klonische Krämpfe
Nikäthamid	210	—	10	8	80	7	70	
		30	10	6	60	1	10	

Auch im Gehirn dürfte also eine Senkung des Membranpotentials unter der Wirkung krampferzeugender Analepticum-Dosen vorhanden sein, wie sie am Froschmuskel an Hand des Verletzungspotentials, allerdings erst bei höheren Konzentrationen, wahrscheinlich gemacht werden konnte.

In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen des Arbeitskreises in Salt Lake City von besonderem Interesse. SWINYARD, TOMAN u. GOODMAN fanden bei Ratten unter *Hyponaträmie* eine Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber Pentetrazol. Die genannten Autoren erreichten eine akute Hyponaträmie durch intraperitoneale Verabreichung isotonischer Glucoselösung, wobei die extracellulären Elektrolyte in die Peritonealflüssigkeit abwandern. Nach SWINYARD, SCHIFFMAN u. GOODMAN wird der Plasma-Natriumspiegel hierbei etwa 11,8% gesenkt. In diesem Zustand

tritt der minimale Krampf auf i.v. Pentetrazolgaben bei Dosen ein, die etwa 32% niedriger liegen als bei Normaltieren. Auch die Elektrokrampfschwelle liegt unter diesen Bedingungen etwa 37% niedriger als bei unvorbehandelten Kontrollen. Elektroschock und Pentetrazolschock verhalten sich bei der Hyponaträmie also ähnlich (siehe auch Spiegel u. Spiegel-Adolf, Spiegel u. Wycis).

Auffallend ist nun, daß im Gegensatz zur Hyponaträmie die *akute Hypernaträmie* durch Injektion von NaCl und die *chronische Hypernaträmie* durch Behandlung mit DCA die Elektrokrampfschwelle um etwa 30% steigert, also die Erregbarkeit herabsetzt (Timiras, Woodbury u. Goodman, Swinyard, Schiffman u. Goodman). Hypernaträmie steigert jedoch nicht die Resistenz der Tiere gegen Pentetrazol, vielmehr liegt die mittlere konvulsive Dosis bei chronischer Hypernaträmie (Steigerung des Plama-Na etwa 10,5%) für den minimalen Pentetrazolkrampf 21% unter der der Kontrollen.

Bei der Hyponaträmie verhalten sich Pentetrazol und Elektroschock also ähnlich, bei der Hypernaträmie jedoch gegensätzlich. Für den Elektroschock gilt die Regel, daß mit Ansteigen des Quotienten extra/intracelluläres Natrium im Gehirn die Reizbarkeit abnimmt und mit sinkendem Quotienten steigt (s. auch Timiras, Woodbury u. Agarwal). Dies gilt jedoch nicht für Pentetrazol. Die gesteigerte Empfindlichkeit des Gehirns gegenüber diesem Krampfgift bei Anstieg des extracellulären Natrium dürfte in einem Defekt der selektiven Kationenpermeabilität bzw. wie Swinyard, Schiffman u. Goodman annehmen, in einem Versagen der sog. „Natriumpumpe" liegen. Für eine Störung der selektiven Permeabilität dürften auch unsere Versuche sprechen. Bemerkenswert ist, daß von Woodbury für das Diphenylhydantoin ein Angriff an der „Natriumpumpe" der Nervenzelle wahrscheinlich gemacht werden konnte.

Einen weiteren Hinweis auf die zentrale Bedeutung der sich an den Grenzflächen der Zellen abspielenden Erscheinungen für die Krampfentstehung ist der schon von Zipf u. Hoppe nachgewiesene Antagonismus von Procain gegenüber Analeptica.

Bernhard u. Bohm zeigten, daß kleine i.v. Dosen von Xylocain im Versuch an der Katze zentrale epileptiforme Nachentladungen und poststimulatorische Krämpfe blockieren können.

Bei der analeptischen Wirkung der geprüften Pharmaka dürfte es so sein, daß eine partielle Depolarisation der Nervenzellgrenzfläche die Angriffsmöglichkeit physiologischer Erregungsstoffe verbessert. So wird bei lokaler Anwendung von Acetylcholin die Hirnrinde durch unterschwellige parenterale Pentetrazoldosen aktiviert (Forster u. Madow). Kommt es bei höherer Dosierung des Analepticums zur völligen Depolarisation, zu Krämpfen und Hyperkaliämie, so resultiert schließlich eine Vertiefung der Narkose bzw. Lähmung.

Zusammenfassung

In Versuchen am isolierten Froschrectus zeigte sich eine Kontrakturwirkung der untersuchten Analeptica (DO 601, Pentetrazol, Nikäthamid und Pikrotoxin), einhergehend mit Kaliumfreisetzung und Absinken des Verletzungspotentials (auch in situ nach Injektion der Analeptica.) Die Kontrakturwirkung von DO 601 bleibt auch unter der Einwirkung von Hexobarbital-Na erhalten und wird durch Procain gehemmt.

Pentetrazol und DO 601 führen nach i.v. Injektion beim Kaninchen zu einer starken Hyperkaliämie, die durch Curarisierung verhindert wird.

Die festgestellte Abnahme des Chlorraumes im Gehirn unter der Wirkung von Analeptica dürfte auf einem Abstrom von extracellulärem Wasser in die Zelle beruhen.

Es wurde eine erhebliche Verschiebung der extra- und intracellulären Elektrolyte im Gehirn beobachtet.

Literatur

Bernhard, C. G., u. E. Bohm: Experientia (Basel) **10**, 474 (1954). — Brit. J. Pharmacol. **10**, 288 (1955). — Boyle, P. J., and E. J. Conway: J. of Physiol. **100**, 1 (1941). — Boyle, P. J., E. J. Conway, F. Kane and H. L O'Reily: J. of Physiol. **99**, 401 (1941). — Cicardo, F.: Rev. Soc. argent. Biol. **22**, 155 (1946). — Colfer, H. F., and H. E. Essex: Amer. J. Physiol. **150**, 27 (1927). — Cotlove, E.: Amer. J. Physiol. **176**, 396 (1954). — D'Silva, J. L.: J. of Physiol. **80**, 7 P (1933). — Amer. J. Physiol. **82**, 393 (1934). — Eggleton, M. G., P. Eggleton and A. M. Hamilton: J. of Physiol. **90**, 167 (1937). — Fenn, W. O.: Physiologie. Rev. **16**, 450 (1936). — Fleckenstein, A.: Die periphere Schmerzauslösung und Schmerzausschaltung, Frankfurt: Steinkopff 1950. — Der Kalium-Natrium-Austausch. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — Forster, F. M., and L. Madow: Amer. J. Physiol. **161**, 426 (1950). — Hardt, A., u. A. Fleckenstein: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 39 (1948). — Hofmann, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **201**, 529 (1943). — Horwitt, S., R. H. Steinberg and F. Liebert: Elgin Papers **3**, 61 (1939). — Kühns, K.: Hoppe-Seyler's Z. **298**, 278 (1954). — Meyer, H. H., u. B. Walter: Nervenarzt **23**, 212 (1952). — Moglia, R., u. F. Cardini: An. Farm. Bioquim. **9**, 105 (1940). — Rothschuh, K. E., u. M. Bogatzki: Pflügers Arch. **253**, 59 (1950). — Schüller, J., u. F. Athmer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **91**, 125 (1921). — Shanes, A. H.: Science (Lancaster, Pa.) **107**, 679 (1948). — Ann. New York Acad. Sci **55**, 1 (1952). — Soehring, K., H. Dass et H. Stave: Arch. internat. Pharmacodynamie **89**, 365 (1952). — Spiegel, E., and M. Spiegel-Adolf: Amer. J. Psychiatr. **92**, 1145 (1936). — Spiegel, E., and H. Wycis: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **42**, 400 (1939). — Stille, G., unveröffentlicht. — Stille, G., u. H. Kröger: unveröffentlicht. — Swinyard, E. A., J. E. P. Toman and L. S. Goodman: J. of Neurophysiol. **9**, 47 (1946). — Swinyard, E. A., D. O. Schiffman and L. S. Goodman: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **114**, 160 (1955). — Timiras, P. S., D. M. Woodbury and P. L. Agarwal: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **115**, 154 (1955). — van Slyke, D.: J. of Biol. Chem. **58**, 523 (1923). — Woodbury, D. M.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **115**, 74 (1955). — Zipf, H. F., E. Kreppel und E. Wetzels: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 348 (1955). — Zipf, K., u. H. Hoppe: Arch. exper. Path. u. Pharm. **67**, 183 (1936).

Dr. G. Stille, Pharmakologische Abteilung der Nordmark-Werke G.m.b.H., Hamburg Werk Uetersen/Holstein

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 26—44 (1957)

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der Ciba Aktiengesellschaft, Basel

Wechselwirkungen zwischen Schwermetallsalzen, insbesondere Kupfersalzen, und verschiedenen Pharmaka an den Coronargefäßen des isolierten Herzens

Von
R. Jaques, J. Tripod und R. Meier

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. August 1956)

In einer Reihe von Arbeiten unseres und anderer Laboratorien wurden die für die besondere Wirkungsweise der blutdrucksenkenden Hydra-zinophthalazine ausschlaggebenden pharmakodynamischen Qualitäten dargestellt[1, 2, 4–7, 12, 13, 20]. Es wurde untersucht, inwieweit die Kreislaufwirkungen von chemisch so vielfältig reaktionsfähigen Substanzen wie Apresolin und Nepresol nach Vorbehandlung mit Blutserum und Eiweißkörpern modifiziert werden[11, 12]. Diese Versuche führten zu einer Bestätigung der auch in einer andern Untersuchung gezogenen Schlußfolgerung, daß nämlich der Wirkungscharakter der eigenartigen Blutdrucksenkung wie auch das komplexe Spektrum der antagonistischen Wirkungen an isolierten Kreislauforganen sich möglicherweise durch eine besondere chemische Reaktionsfähigkeit mit nicht näher definierten Gewebsbestandteilen erklären lassen.

Ferner haben wir beschrieben, daß der starke Hemmungseffekt von Hydrazinderivaten gegenüber Histaminase[7, 17, 19, 24] in spezifischer und je nach Hydrazin verschiedener Weise durch Schwermetalle, im Falle des Apresolins u. a. auch durch Kupfer verhindert werden kann[18]. Ebenfalls wurde von uns gefunden, daß Cu am isolierten Herzen von Frosch und Kaninchen die Wirkung von Herzgiften in typischer Weise verändert[10].

Aus diesen Gründen erschien es möglich, daß den Schwermetallen und insbesondere dem Cu gewisse Wirkungen an Kreislauforganen zukommen, die vielleicht auch in Zusammenhang mit der Wirkung von Apresolin und ähnlichen Hydrazinophthalazinen und im besonderen ihrer Coronarerweiterung stehen. Wir haben deshalb die Wechselbeziehungen von Cu und Hydrazinderivaten am isolierten Kaninchenherzen untersucht. Im Verlauf dieser Versuche stellte sich heraus, daß Apresolin und andere Hydrazinderivate die durch Cu am isolierten Herzen hervorgerufenen Reaktionen, insbesondere die Coronarverengung, in wechselnder Stärke zu beeinflussen vermögen. Da die Cu-antagonistischen

Wirkungen solcher Derivate auf ihrem Schwermetall-Bindungsvermögen beruhen könnten, wurden einige typische bekannte Metallkomplexbildner sowie typische Histaminasehemmer in die Untersuchung einbezogen. Die gewonnenen Ergebnisse erscheinen geeignet, die besondere Wirkungsweise von Hydrazinophthalazinen weiter zu charakterisieren; sie dürften aber auch insofern von allgemeinerem Interesse sein, als sie Aussagen über die chemische Natur von physiologisch an der Reaktionslage des Herzens, insbesondere der Coronargefäße, beteiligten Elementen erlauben.

Methode

Die Versuche wurden am Kaninchenherzen durchgeführt, welches unter Verwendung einer früher von Uhlmann u. Nobile[22] in unserm Laboratorium entwickelten Modifikation der Langendorff-Anordnung isoliert durchströmt wurde. Als Durchströmungsflüssigkeit diente Locke-Lösung, die mit einem Gemisch von 95% O_2 und 5% CO_2 durchperlt wurde. An diesem Testobjekt führt $CuSO_4$ in einer Endkonzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ (ohne Kristallwasser) zu einer deutlichen, nach minutenlanger Latenz einsetzenden und innerhalb etwa 10 min ihre definitive Lage erreichenden Abnahme des Coronardurchflusses bei im übrigen wenig signifikanter Beeinflussung der Herztätigkeit (Abb. 1).

Die zu prüfenden Substanzen wurden neben $CuSO_4$ in Locke-Lösung gelöst und erst dann zur Einwirkung gebracht, wenn die für Cu^{++} typische Coronarverengerung ihre volle Ausbildung erreicht hatte. In getrennten Versuchen wurden die zu prüfenden Substanzen jeweils auf ihre Eigenwirkung untersucht.

Resultate

Die Tab. 1 gibt eine Übersicht über die mit einer Auswahl der untersuchten Verbindungen erhaltenen Ergebnisse. Angegeben sind sowohl die primären Wirkungen der Verbindungen auf den Coronardurchfluß als auch die bei Anwesenheit von Cu^{++} $1 \cdot 10^{-7}$ resultierenden Endeffekte gemessen am Coronardurchfluß. In der Kolonne „Eigenwirkung" finden sich diejenigen Konzentrationen der untersuchten Substanzen, welche eine merkliche, etwa 25%ige Veränderung des Coronardurchflusses (E = Erweiterung, V — Verengerung) bewirken. In der nächsten Kolonne sind diejenigen Konzentrationen der Verbindung aufgeführt, welche eine mindestens 25%ige Veränderung der durch Cu erzeugten Coronarverengerung zur Folge haben, oder diejenigen höchsten Konzentrationen, in welchen sich eine geprüfte Verbindung in Anwesenheit von Cu als wirkungslos erwies.

Es ist aus der Tabelle ersichtlich, daß eine große Zahl der geprüften Stoffe in Anwesenheit von Cu und zum Teil auch ohne vorherige Cu-Verengung coronarerweiternd wirken. Die primär coronarerweiternd wirkenden Stoffe sind (in der Reihenfolge der Wirksamkeit geordnet) die folgenden: Thiocarbamat > Adenosin ≡ Adenosin-5-triphosphorsäure ≡ Nr. 6084 ≡ Apresolin ≡ Nepresol ≡ Adenosin-5-phosphorsäure

Tabelle 1. *Coronarwirkung am isolierten Kaninchenherzen.* (A Antagonismus, S Synergismus, oW ohne Wirkung)

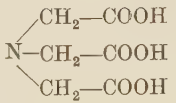
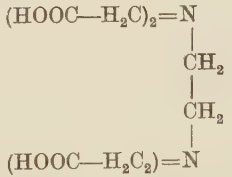
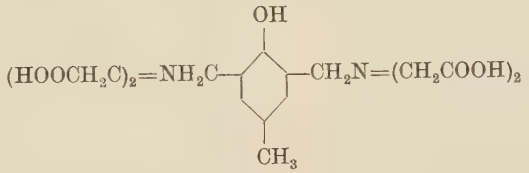
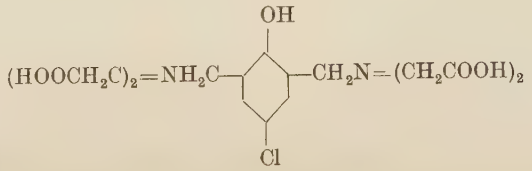
Präparat Nr. Name	Strukturformel	Eigenwirkung	Beeinflussung der verengernden Wirkung von Cu^{++}
15140		V $1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$ A
15141 (EDTA)		⌀ $1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-7}$ A
15303		⌀ $5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-7}$ A
15304		⌀ $5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-7}$ A

Tabelle 1 (Fortsetzung)

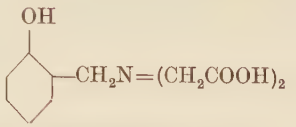
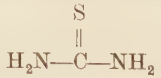
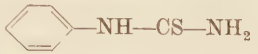
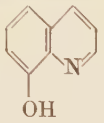
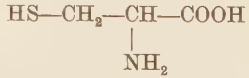
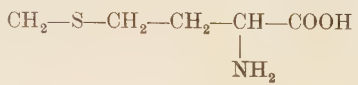
15305		⌀ $1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-7}$ A
Thioharnstoff		E $1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$ A
Phenylthioharnstoff		E $1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$ A
Thiocarbamat	$(C_2H_5)_2NCSSNa$	E $1 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-8}$ A
Oxin		(E $1 \cdot 10^{-7}$)	$1 \cdot 10^{-8}$ A
Na-Pyrophosphat	$Na_4P_2O_7$	V $1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$ oW
Cystein		E $1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$ A
Methionin		E $1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$ A

Tabelle 1 (Fortsetzung)

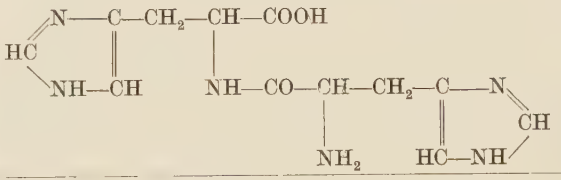
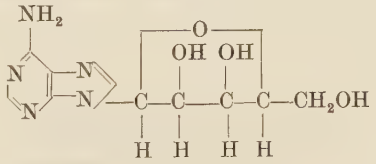
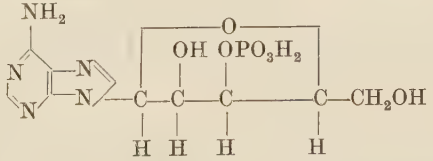
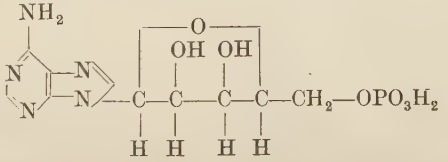
Präparat Nr. Name	Strukturformel	Eigenwirkung	Beeinflussung der verengernden Wirkung von Cu^{++}
Histidylhistidin		E $1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$ A
Adenosin		E $1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$ A
Adenosin-3-phosphorsäure (Hefeadenylsäure)		E $1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$ A
Adenosin-5-phosphorsäure		E $1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$ A

Tabelle 1 (Fortsetzung)

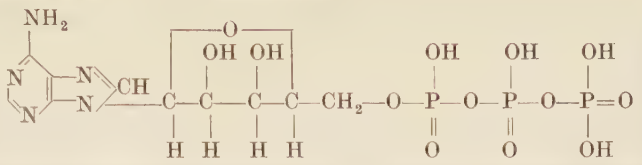
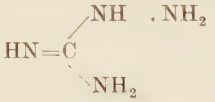
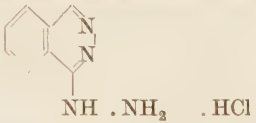
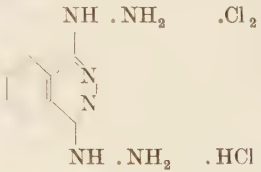
Adenosin-5-triphosphorsäure = ATP		E $1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$ A
Protaminsulfat		V $1 \cdot 10^{6}$	$1 \cdot 10^{-6}$ S
Aminoguanidin		V $1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$ oW
Semicarbazid		E $1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$ A
Apresolin (5968)		E $1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$ A
Nepresol (7441)		E $1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$ A

Tabelle 1 (Fortsetzung)

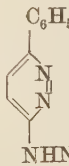
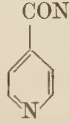
Präparat Nr. Name	Strukturformel	Eigenwirkung	Beeinflussung der verengernden Wirkung von Cu^{++}
6084		E $1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$ A
7312		E $1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-6}$ A
13683		⌀ $1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$ oW
Hydrazinhydrat	H_2NNH_2	E $1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$ A
Hydroxylamin	$H_2N—OH$ .HCl	E $1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$ A
Isonicotinsäure-isopropyl-hydrazid		E $1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$ A

Tabelle 1 (Fortsetzung)

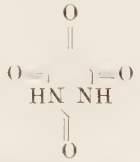
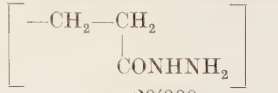
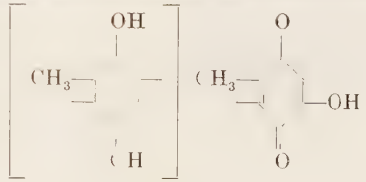
Isonicotinsäurehydrazid		V $1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$ oW
Isonicotinsäure		⌀ $1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$ oW
Alloxan		⌀ $1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$ oW
16913	 x = ca 20′000	⌀ $1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$ oW
16925		E $1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$ A

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Präparat Nr. Name	Strukturformel	Eigenwirkung	Beeinflussung der verengernden Wirkung von Cu^{++}
Compound 48/80		V $1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$ S
13259a		V $1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$ A

≡ Hydroxylamin > Adenosin-3-phosphorsäure ≡ Nr. 16925 ≡ Histidyl-histidin ≡ Methionin > Phenylthioharnstoff ≡ Cystein > Isonicotinsäure-isopropyl-hydrazid ≡ Nr. 7312 ≡ Semicarbazid ≡ Thioharnstoff ≡ Hydrazin-hydrat. Alle andern Stoffe bewirken entweder keine primäre Coronarerweiterung oder rufen sogar primäre Coronarverengerung hervor.

Die Iminoessigsäurederivate (Nr. 15140, 15141, 15303—15305) heben die Cu-Verengerung auf, trotzdem sie bis in hohe Konzentrationen entweder keine oder nur eine schwache coronarconstrictorische Wirkung entfalten. Ein Diamino-diphenyl-disulfosäurederivat (Nr. 13259a) wirkt primär verengend, aber in Anwesenheit von Cu erweiternd.

Ein typisches Beispiel der direkten erweiternden Wirkung auf die Coronargefäße ist in Abb. 2 wiedergegeben.

Die in Anwesenheit von Cu wirksamen Verbindungen umfassen außer den Derivaten der Iminoessigsäure und der Diaminodiphenyldisulfosäure, Thioverbindungen, Hydroxylamin-, bzw. Hydrazinderivate, Purinderivate, ein

Peptid, ein Chinolin sowie einen synthetischen Huminstoff (polymeres Toluchinon, Nr. 16925).

Thiocarbamat (Na-Diäthyl-dithiocarbamat) oder Oxin (8-Hydroxychinolin) gehören zu den wirksamsten Antagonisten. Beide zeigen noch in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-8}$ eine deutliche Coronarerweiterung in Anwesenheit von Cu. Die Abb. 3 zeigt die Wirkung von Oxin auf eine durch Cu verursachte Verengerung der Coronargefäße. Oxin zeigt allein

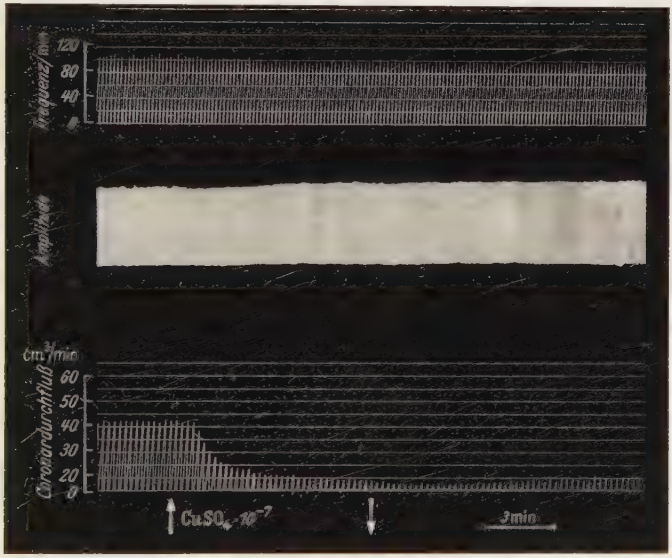


Abb. 1. Coronarverengerung durch $CuSO_4$ $1 \cdot 10^{-7}$

nur in hohen Verdünnungen ($1 \cdot 10^{-8}$—$1 \cdot 10^{-7}$) eine leichte coronarerweiternde Wirkung, die bei höheren Konzentrationen verschwindet. Nach ihrer antagonistischen Wirksamkeit geordnet ergibt sich folgende Reihenfolge der Stoffe: Thiocarbamat ≡ Oxin > Adenosin ≡ Adenosin-5-triphosphorsäure ≡ Nr. 15141 (EDTA) ≡ Nr. 15303—15305 ≡ Nr. 6084 > Apresolin ≡ Nepresol ≡ Hydroxylamin ≡ Adenosin-3-phosphorsäure ≡ Adenosin-5-phosphorsäure ≡ Nr. 16925 ≡ Histidylhistidin ≡ Nr. 7312 ≡ Phenylthioharnstoff ≡ Nr. 13259a > Isonicotinsäure-isopropylhydrazid ≡ Methionin ≡ Cystein ≡ Nr. 15140 ≡ Semicarbazid ≡ Thioharnstoff ≡ Hydrazinhydrat. Die Reihenfolge der Stoffe nach der primären coronarerweiternden Wirksamkeit und der Cu-antagonistischen Wirksamkeit ist somit in dieser Gruppe weitgehend identisch, doch ergeben sich einzelne Ausnahmen wie z. B. bei Präp. 7312, das erst in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-4}$ primär erweitert, dagegen schon in 100mal geringerer Konzentration die Cu-Wirkung aufhebt.

Unter den Verbindungen, welche etwa 10—100 mal schwächer wirken als Thiocarbamat und Oxin, befinden sich die meisten der untersuchten Iminoessigsäurederivate, Purinderivate, Hydrazin- bzw. Phthalazinderivate, die teils die für Apresolin typischen blutdrucksenkenden Eigenschaften besitzen (Nr. 6084, Nepresol), teils aber bei guter Hemmwirkung gegenüber Diaminoxydase eine blutdrucksenkende Wirkung vermissen lassen (Nr. 7312). In diese Gruppe gehören auch der synthetische Huminstoff (Nr. 16925), Phenylthioharnstoff sowie Hydroxylamin.

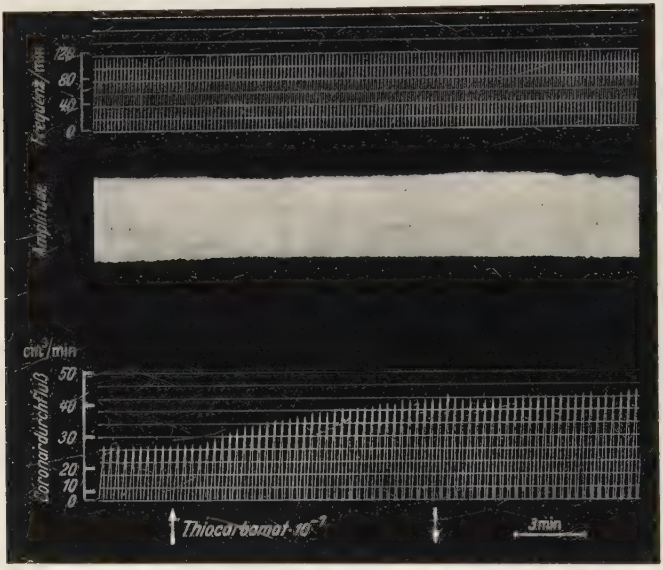


Abb. 2. Coronarerweiternde Wirkung von Thiocarbamat $1 \cdot 10^{-7}$

Eine nächstfolgende Gruppe von in relativ hohen Konzentrationen wirksamen Verbindungen umfaßt Aminosäuren wie Cystein und Methionin, ein Iminoessigsäurederivat (Nr. 15140), ferner Semicarbazid, Thioharnstoff und Hydrazinhydrat.

Zu den gegenüber der Cu-Verengerung der Coronargefäße bis in hohe Konzentrationen wirkungslosen Verbindungen gehören: das typische Fe-Reagens Na-Pyrophosphat, Isonicotinsäure und deren Hydrazid, 5-Hydrazinopyridazin (Nr. 13683), Aminoguanidin, Alloxan sowie ein polymeres Acrylsäurehydrazid (Nr. 16913).

Als einzige der von uns untersuchten Verbindungen erwies sich, wie schon erwähnt, ein Diamino-diphenyl-disulfosäurederivat (Nr. 13259a) als bereits in niederen Konzentrationen primär coronarverengernd und in Gegenwart von Kupfer dilatierend.

Die coronarverengernde Wirkung von Cu wird aber meist bei Substanzen, welche eine primär verengernde Eigenwirkung besitzen, wie Protaminsulfat und der Histaminliberator Compound 48/80, verstärkt; bei ihnen addiert sich die verengernde Wirkung annähernd zu derjenigen von Cu.

Diskussion

Um die vorliegenden Ergebnisse in bezug auf den Wirkungstypus der untersuchten Verbindungen näher zu charakterisieren und um Aussagen über die Spezifität der beobachteten Wirkungen machen zu können, ist

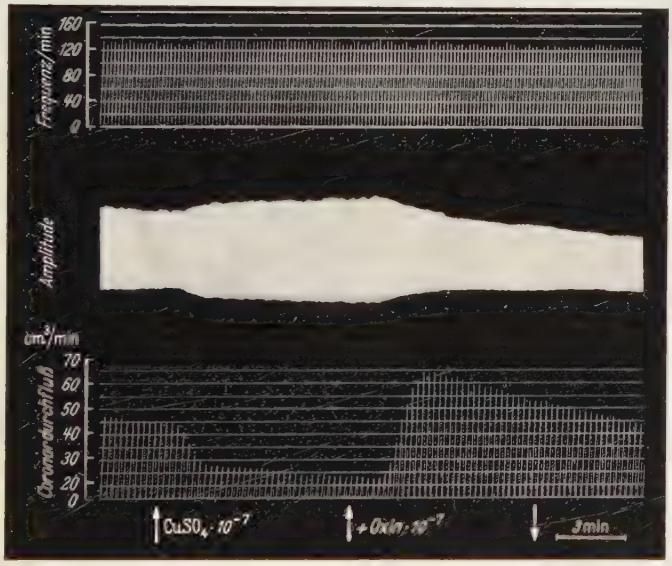


Abb. 3. Aufhebung der durch $CuSO_4$ $1 \cdot 10^{-7}$ hervorgerufenen Coronarverengerung durch Oxin $1 \cdot 10^{-7}$

zunächst abzuklären, inwieweit die bei der Durchströmung des isolierten Kaninchenherzen mit Cu-haltigen Lösungen beobachteten Coronarverengerungen auch andern Schwermetallen zukommt. Wie aus der Abb. 5 ersichtlich ist, besitzt von den untersuchten Metallionen Cu^{++}, Fe^{++}, Fe^{+++}, Co^{++}, Mn^{++}, Ni^{++} einzig Cu^{++} eine bereits mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-8}$ erfaßbare und in der Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ erhebliche, coronarverengernde Wirkung, ohne dabei die übrigen Herzfunktionen (Frequenz und Amplitude) zu beeinflussen (Abb. 5).

Eine Coronarverengerung ist auch bei Ferro- und Ferri-Eisen in Konzentrationen nachweisbar, die allerdings um eine Zehnerpotenz höher liegen als bei Cu und zudem im Gegensatz zu Cu^{++} gleichzeitig toxische Effekte im Sinne einer erheblichen Frequenz- und Amplitudenreduktion hervorrufen. Sowohl Co^{++} als auch Mn^{++} besitzen eine angedeutete, konzentrationsunabhängige coronarerweiternde

Wirkung und sind im übrigen bis in hohe Konzentrationen auffallend wenig toxisch. Bei Ni^{++} zeigt sich in den untern Konzentrationen eine leichte coronarerweiternde Wirkung mit etwas stärker ausgeprägten toxischen Auswirkungen auf Frequenz und Amplitude in hohen Konzentrationen.

Aus diesen Ergebnissen darf entnommen werden, daß dem Cu^{++} unter den Schwermetallen eine besondere, in niedrigen Konzentrationen eintretende coronarconstrictorische Wirkung zukommt.

Substanzen, welche die Coronarwirkung von Cu aufzuheben vermögen, können deshalb einen besonderen Wirkungstypus darstellen. Diese Auf-

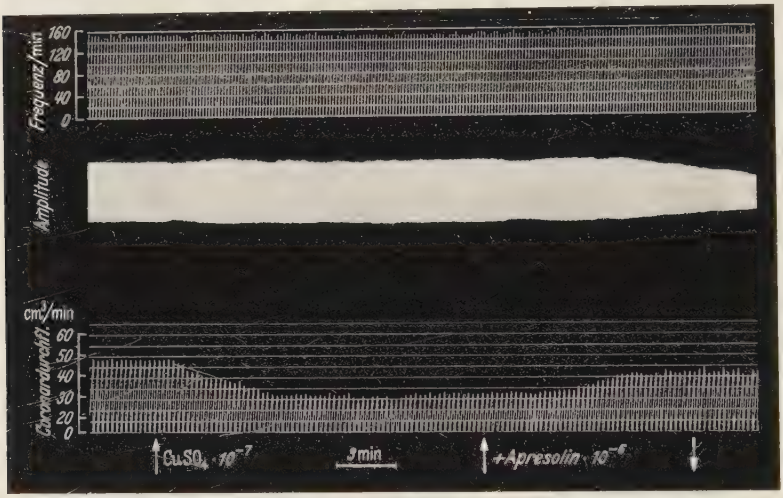


Abb. 4. Deutliche Antagonisierung der Coronarwirkung von Cu durch Apresolin $1 \cdot 10^{-6}$

fassung dürfte auch Gültigkeit haben, trotzdem die vorliegenden Versuche keine Aufschlüsse darüber ergeben, ob die nach Durchströmung mit einem Gemisch Cu + „Antagonist" als Coronareffekt gemessene Endwirkung dieses Gemisches darauf beruht, daß der „Antagonist" Cu^{++} bindet oder seine Wirkung trotz der Anwesenheit von Cu^{++}-Ion entfaltet. Relativ gesichert ist eine Deutung der Befunde als „Komplexbildung"[16] zunächst nur in jenen Fällen, in denen die durch Cu erzeugte Coronarkonstriktion durch Konzentrationen einer Substanz aufgehoben wird, die niedriger sind als diejenigen, welche selbst coronarerweiternd wirken. Dies gilt z. B. für Präp. Nr. 7312 und Semicarbazid. Weiterhin gilt diese Folgerung für die Gruppe, die selbst keine Coronarerweiterung bewirkt, wie die Präparate Nr. 15140, 15141, 15303, etc.

Diese Gruppe von Stoffen muß aber scharf von der andern getrennt werden, in der sich Antagonisten finden, die selbst coronarerweiternde Wirkungen besitzen, aber trotzdem — eventuell durch Komplexbildung — die Cu-Wirkung aufheben.

Die wesentliche Voraussetzung diese Frage zu entscheiden, wäre die genaue Kenntnis der quantitativen Komplexbildungsverhältnisse der untersuchten Stoffe. Solche Daten sind nur zum Teil vorhanden. Wir haben deshalb mit einigen typischen Vertretern der von uns untersuchten Substanzen versucht, eine Schätzung des Komplexbildungsvermögens vorzunehmen, indem Cu und die zu untersuchende Verbindung in verschieden molaren Verhältnissen gemischt wurden. Es ergaben sich dabei folgende Befunde (siehe Tab. 2). Nr. 15141 (EDTA) und Histidylhistidin[23] intensivieren die blaßblaue Farbe einer $M/_{400}$ $CuSO_4$-Lösung, wobei EDTA schätzungsweise 3mal wirksamer ist als Histidyl-histidin. EDTA erweist sich dabei erstaunlich wirksam, indem es selbst in einer Endkonzentration von $M/_{20\,000}$ noch eine von bloßem Auge eben erkennbare Verstärkung der Blaufärbung herbeiführt. Apresolin führt zu einer Intensivierung in einer deutlich blau-violetten Farbqualität; diese Intensivierung ist noch mit einer Endkonzentration von $M/_{6\,000}$ erkennbar. Thiocarbamat führt zu der für dieses Kupferreagens typischen Braunfärbung, welche in den Endkonzentrationen von $M/_{200}$ und $M/_{2\,000}$ nach einigem Stehen von einer Fällung gefolgt ist. Adenosin und Phenylthiobarnstoff bewirken in Endkonzentrationen bis $M/_{200}$ keine Farbänderung; höher konzentrierte Lösungen von Phenylthioharnstoff dagegen ergaben weiße Fällungen. Die geprüften Stoffe zeigen somit sowohl in quantitativer wie qualitativer Hinsicht deutliche Unterschiede.

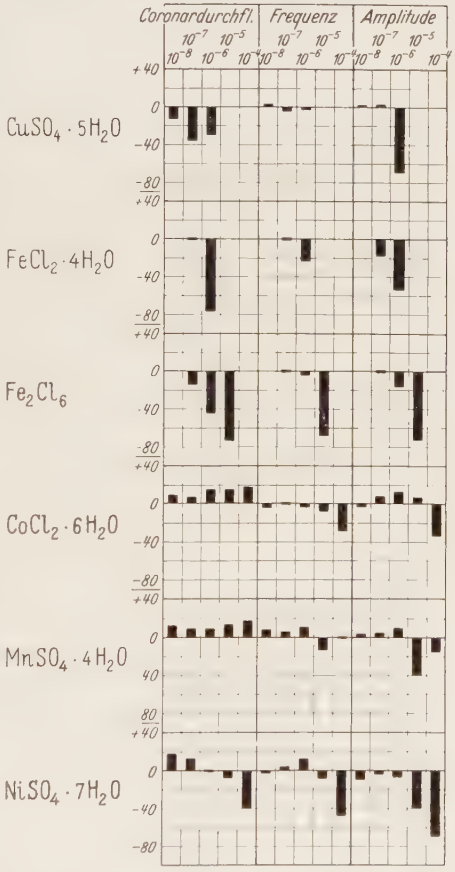


Abb. 5. Wirkung verschiedener Schwermetalle am nach LANGENDORFF isoliert durchströmten Kaninchenherzen. Prozentuale Veränderung von Coronardurchfluß, Frequenz und Amplitude

Weitere Schlüsse in dieser Hinsicht lassen sich auch auf Grund folgender Befunde ziehen. Es ist von uns beschrieben worden, daß Hydrazine Histaminase

hemmen. Diese Hemmung kann durch Metalle und in besonderen Fällen auch durch Cu verhindert werden. Dabei sind zwischen den einzelnen Histaminasehemmern Unterschiede vorhanden, welche die Stärke und Spezifität der Komplexbindung belegen, indem z. B. Cu nur die Apresolinhemmung verhindert, dagegen diejenige von Isonicotinsäurehydrazid nicht[18]. Auch diese Befunde umfassen vorläufig nur eine Auswahl der auf Coronarwirkung geprüften Stoffe, so daß nur die systematische Prüfung der antagonistischen Verhältnisse aller Stoffe ein allgemeines Urteil der Komplexverhältnisse in biologischem Milieu ergeben könnte.

Tabelle 2. *Farbänderungen von $CuSO_4$-Präparatgemischen** (Endkonzentrationen)

Beigemischtes Präparat	$M/_{200}$	$M/_{2000}$	$M/_{6000}$	$M/_{20'000}$
Nr. 15141 (EDTA)	intensiv blau	blau	blau	hellblau
Apresolin	intensiv blauviolett	blauviolett	hellblauviolett	blaßblau
Adenosin	blaßblau	blaßblau	blaßblau	blaßblau
Histidyl-histidin	intensiv blau	blau	hellblau	blaßblau
Thiocarbamat	braun (später Fällung)	braun (später Fällung)	hellbraun	blaßbraun
Phenylthio-harnstoff	blaßblau	blaßblau	blaßblau	blaßblau

* Farbe von $CuSO_4$ $M/_{400}$: blaßblau.

In Zusammenhang mit dem Befund, daß der synthetische Huminstoff Nr. 16925 eine deutliche Cu-antagonistische Wirkung besitzt, erscheint die Tatsache von Interesse, daß natürliche Huminsäuren ein starkes Cu-bindungsvermögen zeigen[8].

Diese Befunde geben somit nur hinsichtlich derjenigen Stoffe, die selbst keine Coronarverengerung zeigen, Auskunft. Bei diesen scheint die Hemmung der Cu-Wirkung etwa der komplexbildenden Fähigkeit zu entsprechen. Bei den andern kann vorläufig nur das gleichzeitige Vorhandensein der beiden Wirkungen festgestellt und daraus der Schluß gezogen werden, daß zwischen der Cu-Affinität, bzw. der Hemmung der Cu-Wirkung und der direkten Wirkung ein Zusammenhang insofern besteht, als sie die relative Affinität zu Cu und anderen Reaktionsorten anzeigen. Ob der Angriffspunkt der primären Wirkung irgendwelche Beziehung in chemischer Hinsicht zum Cu hat, bleibt offen.

Die Spezifität der Cu-antagonistischen Wirkung wurde durch folgende Befunde belegt:

Einige typische Vertreter der gegenüber Cu wirksamen Verbindungen erwiesen sich, wie aus Tab. 3 hervorgeht, gegenüber einer durch Ferro- und Ferri-Ion erzeugten Coronarkonstriktion mit Ausnahme von ATP

als wirkungslos. ATP ist dabei gegenüber Fe^{++} deutlich wirksamer als gegenüber Fe^{+++}.

Der Unterschied der antagonistischen Wirkung gegenüber den beiden Metallen kann einerseits in der verschiedenen Komplexbindung gegenüber ihnen beruhen oder aber darin, daß die Aufhebung des Cu- und Fe-Effektes am Substrat differenter Effectoren bedarf. Zwischen diesen beiden Möglichkeiten kann nicht entschieden werden, weil auch hier wieder die genaue Kenntnis der komplexchemischen Verhältnisse notwendig wäre.

Bei dem Zusammenhang der Histaminasehemmung durch Hydrazine mit Cu[18] scheint die Berücksichtigung der Histaminase als möglichem Angriffsort der Wirkungen denkbar. Die beobachteten coronarerweiternden Wirkungen, im besonderen diejenige der Hydrazine, dürften aber nicht im wesentlichen Ausmaß auf die histaminasehemmenden Eigenschaften solcher Verbindungen zurückzuführen sein, weil keine einfache gesetzmäßige Relation zwischen Grad der Coronarerweiterung und Histaminasehemmung besteht. Insbesondere erwies sich der äußerst wirksame Histaminasehemmer Aminoguanidin[17] als in höheren Dosen coronarverengend und als wirkungslos gegenüber Cu. Des weiteren ist eine etwaige Beteiligung einer „Histaminanhäufung" an der Coronarerweiterung als maßgeblicher Mechanismus auszuschalten, weil ein typischer Histaminliberator wie Compound 48/80 unter den angewandten Versuchsbedingungen coronarverengend und mit Cu synergistisch wirkt.

Ob bei einzelnen Verbindungen eine Anoxie oder Hypoxie[9] die in Abwesenheit von Cu beobachtete Coronarerweiterung, aber auch die Aufhebung der durch Cu bedingten Coronarverengerung hervorruft, kann an Hand unseres Materials nicht angegeben werden. Es bleibt somit trotz der weitgehenden

Tabelle 3. *Coronarwirkung am isolierten Kaninchenherzen*

Präparat Nr. Name*	Eigenwirkung	Beeinflussung der verengernden Wirkung von $FeCl_3$ ($3—5 \cdot 10^{-7}$)			Beeinflussung der verengernden Wirkung von Fe_2Cl_6 ($5 \cdot 10^{-7}$)		
		Antag.	Synerg.	Wirkungslos	Antag.	Synerg.	Wirkungslos
Nr. 15141	$\supset 1 \cdot 10^{-4}$		$(1 \cdot 10^{-5})$**	$1 \cdot 10^{-6}$		$2 \cdot 10^{-7}$	
Nr. 13279a	V $1 \cdot 10^{-7}$			***		$1 \cdot 10^{-6}$	
Apresolin	E $1 \cdot 10^{-7}$		$(1 \cdot 10^{-6})$**			$(1 \cdot 10^{-6})$**	
Nepresol	E $1 \cdot 10^{-7}$		$(1 \cdot 10^{-6})$**				***
Adenosintriphosphat	E $1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$			$1 \cdot 10^{-5}$		
Na-Pyrophosphat	V $1 \cdot 10^{-5}$		$1 \cdot 10^{-5}$			$1 \cdot 10^{-4}$	

* Formeln siehe Tab. 1. ** Uncharakteristische Wirkung. *** Nicht geprüft.

Charakterisierung der Wirkung der Mechanismus der Cu-antagonistischen Wirkung, soweit er nicht auf einer Ausschaltung durch Komplexbildung beruht, zum Teil ungeklärt.

Die vorliegenden Versuche bieten aber eine weitere Möglichkeit, um physiologisch am Coronartonus beteiligte Faktoren zu diskutieren. Unter den Befunden erscheinen folgende in dieser Beziehung verwendbar:

1. Von den untersuchten Schwermetallen nimmt Cu^{++} offensichtlich eine Sonderstellung ein, indem es als einziges in niedrigen Konzentrationen eine reine Coronarwirkung zeigt.

2. Komplexone wie die Iminoessigsäurederivate heben die Cu-Wirkung auf, haben aber sonst keinen Effekt auf die Coronargefäße.

3. Andere Stoffe, die ebenso zum Teil Cu-Komplexbildner sind, besitzen außer der Aufhebung der Cu-Wirkung eine primäre coronarerweiternde Wirkung. Unter diesen sind in auffallend starkem Maße diejenigen primär coronarerweiternd, welche besonders gut mit Cu^{++} reagieren. Dabei scheint eine gewisse positive Korrelation zu bestehen zwischen der Affinität für Kupfer, gemessen an der Aufhebung der Coronarwirkung, und der in getrennten Versuchen festgestellten coronarerweiternden Wirkung solcher Verbindungen.

4. In einem Fe-haltigen System erweisen sich mit Ausnahme von ATP andere gegenüber Cu^{++} wirksame Verbindungen als wirkungslos. Pyrophosphat, das im allgemeinen als typischer Eisenkomplexbildner angesehen wird, hebt allerdings wider Erwarten die constrictorische Wirkung von Fe^{++} und Fe^{+++} nicht auf. Da EDTA/(Nr. 15141) trotz seiner Bindungsfähigkeit für divalente Ionen[16] im Fe^{++}-System ebenfalls unwirksam ist, wäre es denkbar, daß das negative Ergebnis unserer Versuche in dieser Richtung mit den Eigenheiten der Lösungsverhältnisse zusammenhängt, oder daß mit Ausnahme des ATP-Fe-Komplexes die übrigen Komplexe die für ionisiertes Fe^{++} charakteristischen constrictorischen Eigenschaften beibehalten.

Aus diesen Befunden ergibt sich, daß Komplexbildungsfähigkeit allein genügt, um die Cu-Wirkung aufzuheben, aber nicht ausreicht, um eine primäre Coronarerweiterung zu bedingen. Bei Substanzen, die diese primäre Coronarerweiterung besitzen, ist ebenfalls Komplexbindungsfähigkeit zu Cu vorhanden. Da diese aber an sich nicht die primäre Wirkung bedingt, kann das gleichzeitige Auftreten beider Effekte nur so erklärt werden, daß diese Stoffe außer der einfachen Cu-Komplexbildung sich noch mit andern „Cu-artig" reagierenden Bestandteilen der Zelle verbinden. Diese Reaktion wäre dann die Ursache der primären Wirkung. Sie kann auch für die Cu-antagonistische Wirksamkeit in Betracht kommen. Will man diese Hypothese anerkennen, so könnte man weiter folgern, daß die Cu-Verengerung an dem gleichen Substrat, aber in entgegengesetzter Weise angreift. Es könnte sich somit ergeben, daß Cu zu einem

physiologischen Coronarverengerungsmechanismus eine nicht nur formale sondern auch biochemische Verwandtschaft besitzt. Was für eine das ist, kann nur vermutet werden.

Da Cu ebenso wie Cu-haltige Fermente eine starke katalytische Wirkung auf die Oxydation[3] der im Herzen in reichlichem Maße nachgewiesenen Catecholamine[14, 15] haben, diese aber für die Coronarerweiterung wichtig sind, könnte in der gehemmten oder enthemmten „Oxydation" derselben in Anwesenheit von Cu und seiner Antagonisten die Ursache der Wirkungen erblickt werden. Diese einfache Hypothese kann allerdings wohl kaum allein die beobachteten Effekte erklären, da Cu auch an peripheren Gefäßen verengernd wirkt, an denen Adrenalin ebenfalls einen constrictorischen Effekt besitzt. Trotzdem scheint der dargelegte Gedankengang als Erklärungsmöglichkeit von Interesse.

Die Untersuchung der beschriebenen antagonistischen Effekte kann somit zur weiteren Abklärung des Wirkungsmechanismus in biochemischer Hinsicht von Bedeutung sein. Als besonders wichtig scheinen sie weitere Möglichkeiten für die Deutung des Angriffspunktes blutdrucksenkender Hydrazine zu bieten.

Zusammenfassung

Am isolierten Kaninchenherzen nach Langendorff wurde der Einfluß von Kupfer sowie von in Gegenwart von Kupfer wirkenden Verbindungen (Iminoessigsäurederivate, Hydroxylamin- bzw. Hydrazinderivate, Purinderivate u. a.) untersucht.

Zudem wurde in getrennten Versuchen die Eigenwirkung der geprüften Verbindungen sowie diejenige anderer Schwermetallsalze ermittelt.

Von den untersuchten Metallionen Cu^{++}, Fe^{++}, Fe^{+++}, Co^{++}, Mn^{++} und Ni^{++} besitzt einzig Cu^{++} in niedrigen Konzentrationen eine typische, reine coronarverengernde Wirkung.

Es ergab sich, daß eine Reihe von chemisch und pharmakologisch verschiedenen Verbindungen in Gegenwart von Cu coronarerweiternd wirken. Zu diesen gehören Iminoessigsäurederivate, Purine, gewisse Hydroxylamin- bzw. Hydrazinderivate, Thioverbindungen, Histidylhistidin, Oxin, ein synthetischer Huminstoff (Nr. 16925) sowie ein Diaminodiphenyl-disulfosäurederivat.

Die in Gegenwart von Cu erweiternd wirkenden Substanzen lassen sich prinzipiell aufteilen in

a) Präparate, die wie die Iminoessigsäurederivate, eine durch Cu erzeugte Coronarverengerung aufheben, ohne primär auf die Coronargefäße zu wirken,

b) Präparate, welche wie die Hydrazinderivate, Purinderivate, Thioverbindungen usw. allein coronarerweiternd wirken, und

c) Präparate, die primär coronarverengernd wirken (Nr. 13259a).

Zu den wirkungslosen Verbindungen gehören u. a. Pyrophosphat, einzelne Hydrazide wie Isonicotinsäurehydrazid und Histaminasehemmer wie Aminoguanidin.

Die coronarverengernde Wirkung von Cu wird mit Ausnahme von Präp. 13259a verstärkt durch jene Substanzen, welche auch eine primär verengernde Eigenwirkung besitzen, wie Protaminsulfat und der Histaminliberator Compound 48/80.

Der Wirkungsmechanismus der Cu-Wirkung und der Cu-Antagonisten wird in Zusammenhang mit dem Komplexbindungsvermögen der geprüften Stoffe diskutiert.

Den Herren R. LÖLIGER und E. WIRZ möchten wir für ihre technische Hilfe unseren besten Dank aussprechen.

Literatur

[1] BEIN, H. J., F. GROSS, J. TRIPOD und R. MEIER: Schweiz. med. Wschr. **1953**, 336. — [2] BEIN, H. J., J. TRIPOD R. und MEIER: Experientia (Basel) 8, 74 (1952). — [3] CHAIX, P., and C. PALLAGET: Biochim. et Biophysica Acta **10**, 462 (1953). — [4] DRUEY, J., u. B. H. RINGIER: Helvet. chim. Acta, **34**, 195 (1950). — [5] ERSPAMER, V.: Arch. Int. Med. **80**, 505 (1952). — [6] GROSS, F., J. DRUEY und R. MEIER: Experientia (Basel) **6**, 11 (1950). — [7] GROSS, F., W. SCHULER, J. TRIPOD und R. MEIER: Experientia (Basel) 8, 229 (1952). — [8] LEES, H.: Biochemic. J. **46**, 450 (1950). — [9] MEIER, R., et J. TRIPOD: Arch. internat. Pharmacodynamie **89**, 326 (1952). — [10] MEIER, R., et J. TRIPOD: Arch. internat. Pharmacodynamie **95**, 30 (1953). — [11] MEIER, R., J. TRIPOD und C. BRÜNI: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 338 (1954). — [12] MOYER, J., C. A. HANDLEY and R. A. HUGGINS: J. of Pharmacol. **103**, 368 (1951). — [13] MOYER, J., C. A. HANDLEY and R. A. HUGGINS: J. of Pharmacol. **106**, 407 (1952). — [14] RAAB, W.: Cardiologia (Basel) **22**, 291 (1953). — [15] RAAB, W.: Hormonal and Neurogenic Cardiovascular Disorders, Baltimore: Williams & Wilkins 1953. — [16] SCHNEIDER, W.: Die Komplexbildung N-substituierter Iminodiessigsäurederivate. Diss. Zürich 1955. — [17] SCHULER, W.: Experientia (Basel) 8, 230 (1952). — [18] SCHULER, W., u. R. MEIER: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 169 (1954). — [19] SCHULER, W., u. R. MEIER: Helvet. physiol. Acta **13**, 106 (1955). — [20] TAYLOR, R. D., J. H. PAGE and A. C. CORCORAN: Arch. Int. Med., 88, 1 (1951). — [21] TRIPOD, J., u. R. MEIER: Helvet. physiol. Acta **12**, C33 (1954). — [22] UHLMANN, F., u. F. NOBILE: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **192**, 189 (1939). — [23] WOLFF, G., S. FALLAB und H. ERLENMEYER: Experientia (Basel) **11**, 440 (1955). — [24] ZELLER, E. A.: The Enzymes. Chemistry and mechanism of action Sumner and Myrbäck, Vol. 2, p. 536. New York: Acad. Press 1951.

Prof. Dr. R. MEIER, wissenschaftl. Laboratorium d. Ciba AG, Basel

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230. S. 45—50 (1957)

Aus dem Pharmazeutischen Kontrollinstitut Prag
(Direktor: Dr. F. Tomíček)

Über die Beziehung zwischen der Wirksamkeit von Digitoxin und einigen biologischen Faktoren

Von
B. Mosinger und M. Špačková
In technischer Zusammenarbeit mit F. Ruffer

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Oktober 1956)

Die Variabilität der Einzelwerte von biologischen Auswertungen kann entweder durch rein zufällige oder systematische Einflüsse bedingt sein. Die Herkunft der ersten kann in den meisten Fällen nicht festgestellt werden, da sie in großer Zahl gleichzeitig mitwirken. Ein systematischer Einfluß, der uns zwar bekannt ist, den wir aber nicht eliminieren können, ist unter anderem das Körpergewicht der Versuchstiere. Man pflegt sich in solchen Fällen dadurch zu helfen, daß man die Werte auf die Gewichtseinheit bezieht.

Aber im Jahre 1951 haben Jacobson u. Larsen gezeigt, daß diese Art der Umrechnung bei der gebräuchlichsten Methode für Auswertung von Herzglykosiden nach Knaffl-Lenz (1928) ungünstige Resultate ergibt, wenn wir auch eine beschränkte Variationsbreite der Gewichte (550—800 g) benützen. Zu derselben Schlußfolgerung kamen in letzter Zeit Link u. Kaprinayová (1954) bei statistischer Analyse der Titrationsergebnisse von g-Strophanthin.

Aus beiden Arbeiten geht hervor, daß die Versuchstiere (Meerschweinchen) mit kleinerem Körpergewicht relativ resistenter gegen Herzglykoside sind, so daß man zwecks Begrenzung des Titrationsfehlers nur eine ganz enge Gewichtsvariation (Link u. Kaprinayová 1954) für die Titration der Herzglykoside benützen kann.

Einerseits war es dieser praktische Gesichtspunkt, andererseits die theoretische Frage, mit welchen biologischen Faktoren die Herzglykosidwirkung enger zusammenhängt, welche uns zu einem genaueren Studium anregte.

Methodik

Wir benützten einen Albinostamm von Meerschweinchen männlichen Geschlechtes aus eigener Laboratoriumszucht und zwar mit Gewichten von 105—520 g.

Die kleinste tödliche Dosis (DLM) wurde mit Digitoxinstandard der Konzentration 0,19‰ nach der Knaffl-Lenz-Methode bestimmt. Die Infusionsgeschwindigkeit wurde auf 0,5 ml pro Minute eingestellt.

Nach jeder Titration wurde das Herz des Meerschweinchens herauspräpariert und gewogen.

Ergebnisse

1. Insgesamt haben wir zur Digitoxintitration 49 Meerschweinchen benützt. Zur ersten Orientierung in der statistischen Analyse haben wir die Versuchstiere in fünf Gewichtsgruppen und zwar von ungefähr 100, 200, 300, 400 und 500 g aufgegliedert.

Aus Tab. 1, wo neben Körper- auch Herzgewichte und DLM-Durchschnitte von Digitoxin angeführt sind, folgt, daß mit steigendem Körpergewicht auch die DLM zunimmt, wenn auch in kleinerem Maße: bei der 5. Gruppe ist das Körpergewicht 4,23mal größer als bei der 1. Gruppe, während DLM nur 1,83mal so hoch ist.

Tabelle 1

Nr. der Gruppe	Die Tierzahl in der Gruppe	Durchschnittliche Tiergewichte in g $\pm s_{\bar{x}}$	Durchschnittliche Herzgewichte in g $\pm s_{\bar{x}}$	Durchschnittliche DLM in ml $\pm s_{\bar{x}}$ von 0,019‰ Digitoxinlösung
1.	10	115,7 ± 2,3	0,33 ± 0,008	3,7 ± 0,10
2.	10	218,5 ± 3,7	0,60 ± 0,018	5,0 ± 0,09
3.	9	320,6 ± 2,6	0,80 ± 0,018	5,4 ± 0,40
4.	10	414,4 ± 3,2	1,02 ± 0,024	6,7 ± 0,17
5.	10	490,5 ± 7,6	1,16 ± 0,024	6,9 ± 0,38

Eine genauere Information bekommen wir aus der Gleichung der Regressionsgeraden, die durch die Methode der kleinsten Quadrate berechnet wurde, wie

$$y_1 = 2{,}96 + 0{,}0084\, x, \qquad (1)$$

wo y_1 DLM in Milliliter und x das Meerschweinchengewicht in Gramm bezeichnet. Aus der Gleichung (1) folgt, daß DLM bei Meerschweinchen mit 500 g Körpergewicht um 88% größer ist als bei den mit 100 g Körpergewicht.

Wenn man sich jetzt auf eine enge Gewichtsvariation nicht beschränken will und die Versuchstiere mit beliebigem Gewicht benützt, dann nimmt die Streuung unserer Titrationsergebnisse durch diesen systematischen Fehler noch zu. Anschaulicher ist dies daraus ersichtlich, daß die mittlere Abweichung der Einzelwerte von DLM unseres ganzen Kollektivs (mit dem Mittelwert $y_1 = 5{,}5$ ml) $s_{y_1} = 1{,}41$ war, der Variationskoeffizient $v_{y_1} = 25{,}4 \pm 2{,}73\%$, wobei die durchschnittliche mittlere Abweichung der einzelnen Gewichtsgruppen (siehe Tab. 1) 0,72 mit dem Variationskoeffizienten 13,0 ± 4,2% betragen hat. Der Unterschied zwischen beiden Variationskoeffizienten ist signifikant für $P = 0{,}02$.

2. Es könnte den Eindruck erwecken, daß man die Streuung der DLM-Ergebnisse des ganzen Kollektivs einfach vermindern kann, wenn man die DLM-Einzelwerte auf Gewichtseinheiten umrechnet, was laufend empfohlen und getan wird. Wir haben dies auch in unserem Gesamt-Kollektiv getan. Nach Umrechnung DLM/kg vergrößerte sich

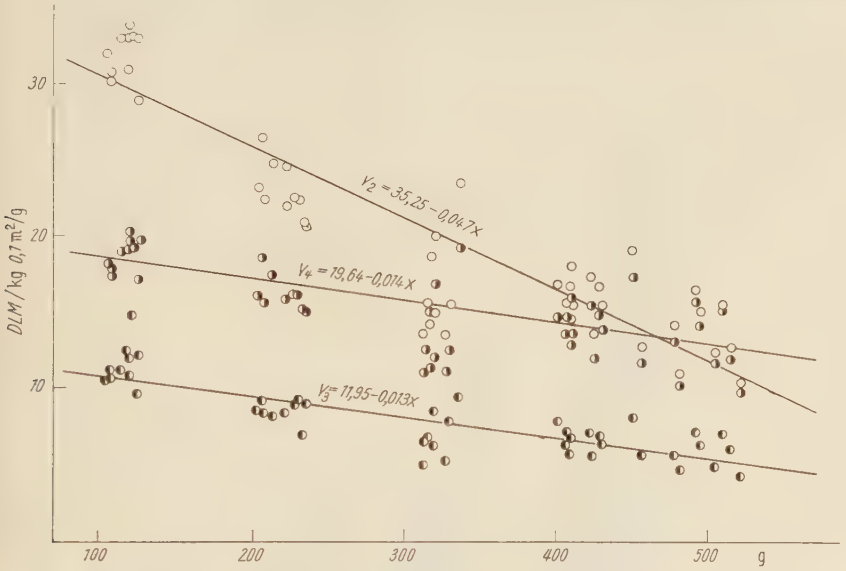


Abb. 1. Die Gleichung der Regressionsgeraden der Abhängigkeit DLM des Digitoxins/kg des Körpers vom Körpergewicht ○——○, DLM/g des Herzens vom Körpergewicht ◐——◐ und DLM/0,1 m² der Körperoberfläche vom Körpergewicht ◑——◑

die mittlere Abweichung dieser Einzelwerte (Mittelwert $y_2 = 20{,}6$ ml/kg) noch relativ auf $s_{y_2} = 7{,}13$, so daß der Variationskoeffizient signifikant für $P = 0{,}05$ auf $v_{y_2} = 34{,}6 \pm 3{,}9\,\%$ zunahm.

Durch die Umrechnung wurde der Einfluß des Körpergewichtes gar nicht eliminiert, sondern die DLM/kg (y_2) wurde indirekt proportional dem Körpergewicht (x). Darum hat die betreffende Gleichung der Regressionsgeraden (Abb. 1)

$$y_2 = 35{,}25 - 0{,}047\ x \qquad (2)$$

einen negativen Regressionskoeffizienten.

Dies bedeutet, daß die Tiere mit kleinerem Körpergewicht relativ widerstandsfähiger gegen Digitoxin sind, wie das Abb. 2A in Prozenten darstellt. Aus der Gleichung (2) kann berechnet werden, daß die Meerschweinchen mit einem Gewicht von 100 g eine um 160% größere DLM/kg haben als die mit einem Gewicht von 500 g. Das kann aber nur dadurch verursacht werden, daß die Abhängigkeit zwischen absoluten DLM-Werten und dem Körpergewicht *nicht linear* ist.

3. Wir haben deshalb versucht, die DLM anstatt auf Körper- auf die Herzgewichtseinheit umzurechnen. Wir haben nämlich vorausgesetzt, daß zu diesem Organ die Digitoxinwirkung in engerer Beziehung steht als zum ganzen Körpergewicht, weil das Wirksamkeitskriterium dieses Stoffes eben der Stillstand des Herzens ist.

Die durchschnittliche DLM/g des Herzens betrug $y_3 = 7{,}91$ ml/g mit der mittleren Abweichung $s_{y_3} = 2{,}45$ und Variationskoeffizient v_{y_3}

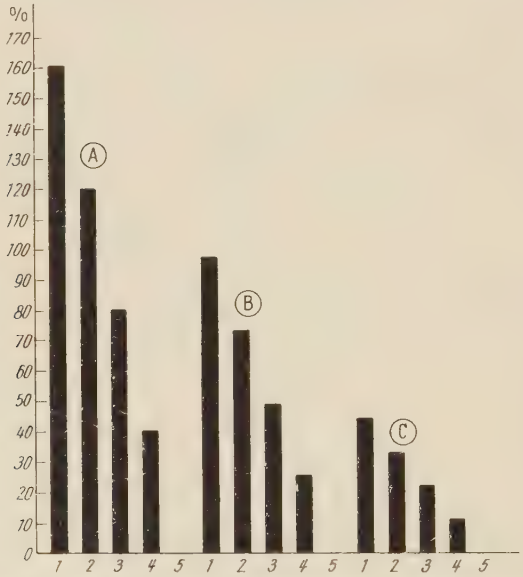


Abb. 2. A. Prozentuelle Differenz in DLM des Digitoxins/kg des Körpergewichts zwischen den Meerschweinchen mit Gewicht von 100 (1), 200 (2), 300 (3), 400 (4) und denen mit 500 g (5). B. Dasselbe wie bei A, nur DLM ist auf Herzgewicht berechnet. C. Dasselbe wie bei A, nur DLM ist auf die Einheit der Körperoberfläche berechnet

$30{,}9 \pm 3{,}41\%$. Der Unterschied zwischen diesem und dem Variationskoeffizienten der Absolutwerte ist statistisch nicht signifikant.

Aus der betreffenden Regressionsgeraden (Abb. 1)

$$y_3 = 11{,}95 - 0{,}013\,x \qquad (3)$$

ist ersichtlich, daß es sich wieder um die indirekte Abhängigkeit mit negativer Linienneigung handelt und daß sich die Versuchstiere mit 100 g von denen mit 500 g Körpergewicht um 98% unterscheiden (Abb. 2B).

4. Man sieht also, daß auch bei der Umrechnung der DLM auf die Herzgewichtseinheit immer die relative Resistenz leichterer, also auch jüngerer Tiere deutlich ist. Es ist bekannt, daß solche Tiere aber auch einen relativ größeren basalen Stoffwechsel haben, in dessen Diensten

natürlich die Blutzirkulation steht, und relativ eine größere Körperoberfläche besitzen als ältere Tiere.

Deshalb haben wir die Oberfläche der Versuchstiere aus unserem Gesamt-Kollektiv festgelegt und zwar nach Meehs Formel

$$s = k \sqrt[3]{G^2},$$

wo s Oberfläche, G Gewicht und k Meerschweinchenkonstante 8,5 ist und dann die DLM auf ihre Einheit 0,1 m² umgerechnet.

Es zeigte sich tatsächlich, daß die mittlere Abweichung $s_{y_4} = 2{,}8$ (Mittelwert $y_4 = 15{,}6$ ml/0,1 m²) relativ gesunken ist, so daß der Variationskoeffizient den Wert nur 17,9 $\pm$ 1,86% erreicht hat. Die Differenz gegen den Variationskoeffizienten von DLM/kg ist hoch signifikant für $P < 0.001$, gegen DLM/g signifikant für $P < 0{,}02$.

Auch die Prozentualdifferenz in DLM/0,1 m² berechnet aus der betreffenden Gleichung (Abb. 1)

$$y_4 = 19{,}64 - 0{,}014\, x \qquad (4)$$

zwischen 100 g- und 500 g-Versuchstieren ist bis zu dem Wert 43% gesunken, also fast auf $^1/_4$ des Wertes, den wir bei Umrechnung auf DLM/kg gefunden haben (Abb. 2C).

Zum Schluß wollten wir uns vergewissern, wie sich diese Berechnungsweise in der Praxis bewährt, wo man (z. B. nach Pharmacopoea Bohemoslovenica Ed. sec.) 12 Versuchstiere in einer Gruppe benützt. Absichtlich haben wir eine ungeneigte Gewichtsvariation benützt, und zwar so, daß wir 6 DLM- aus der ersten und 6 DLM-Bestimmungen aus der fünften Gruppe (siehe Tab. 1) gewählt haben. Bei Umrechnung DLM/kg betrug der Mittelwert $x_1 = 23{,}1 \pm 2{,}9$ ($\pm 12{,}5\%$) ml/kg mit Variationskoeffizient 43,7%, bei Umrechnung DLM/0,1 m² $x_2 = 15{,}9 \pm 1{,}07$ ($\pm 6.7\%$) ml/0,1 m² mit Variationskoeffizient 23,3%. Die mittlere Abweichung des Mittelwertes ist also auf den von de Linde van Wijngaarden (1927) und Knaffl-Lenz empfohlenen Wert 6,7% gesunken.

Diskussion

Anfangs vermuteten wir, daß man durch Umrechnung DLM von Digitoxin auf Herz- anstatt auf Körpergewicht den ungeneigten Einfluß der höheren Resistenz der jüngeren Versuchstiere ausschließen könnten. Es zeigte sich uns jedoch, daß dies nicht der Fall ist und daß wir die relativ besten Resultate, das heißt mit der kleinsten Ergebnisstreuung, durch die Berechnung auf die Oberfläche, fortschreitend schlechtere Resultate mit DLM-Absolutwerten, noch schlechtere bei Berechnung auf das Herzgewicht und die schlechtesten bei Berechnung auf das Körpergewicht erzielen.

Das bedeutet für die Praxis, daß man Meerschweinchen mit der Variationsbreite von 100—800 g mit kleinstem Fehler zur Digitoxintitration

benützen kann. Die Versuchstiere im Gewicht von 500—800 g sind zwar in unser Kollektiv nicht einbezogen, aber für diese Variationsbreite zeigten schon Jacobson u. Larsen (1951), daß die Abhängigkeit Dosis — Körpergewicht linear wird, wenn man das Körpergewicht der Versuchstiere zuerst mit der empirisch festgestellten Zahl 0,686 potenziert. Aber diese Zahl ist numerisch fast gleich mit der Zahl, mit der man das Körpergewicht auf seine Oberfläche umrechnet, also

$$s = k \sqrt[3]{G^2} = kG^{2/3} = kG^{0,666}.$$

Es scheint, daß dadurch der Jacobson-Larsensche Umrechnungsfaktor seine theoretische Begründung bekommt.

Selbstverständlich sind wir uns bewußt, daß die gefundene Abhängigkeit nur die erste Annäherung zur allgemeinen physiologischen Erscheinung der Resistenz von jüngeren Tieren darstellt und daß diese sicher mehr komplexer Natur ist (Kabat, 1940, Malek, 1947, Adolph, 1948 u. a.).

Zusammenfassung

1. Im Einklang mit anderen Autoren stellten wir fest, daß junge Tiere, in unserem Fall Meerschweinchen, resistenter gegen Digitoxinwirkung sind als die älteren.

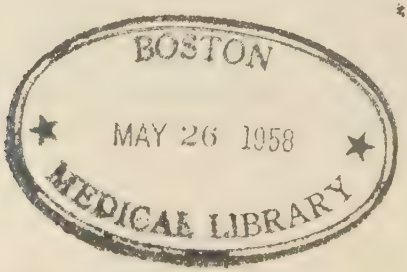
2. Für die Auswertung DLM von Digitoxin ist die allgemein empfohlene Umrechnung auf die Einheit des Körpergewichts ungeeignet, weil sich dadurch der Titrationsfehler vergrößert.

3. Durch statistische Analyse sind wir zu der Schlußfolgerung gekommen, daß man den Einfluß höherer Resistenz der jüngeren Versuchstiere gründlich eliminieren könnte und zwar durch die einfache Umrechnung der DLM von Digitoxin auf die Einheit der Körperoberfläche. Damit wird die Benutzung von Versuchstieren mit der Variationsbreite von 100—800 g ermöglicht, ohne den Titrationsfehler zu vergrößern.

Literatur

Adolph, E. F.: Amer. J. Physiol. **155**, 366 (1948). — Jacobson, E., u. V. Larsen: Acta pharmac. tox. K'hou. **7**, 35 (1951). — Kabat, H.: Amer. J. Physiol. **150**, 588 (1940). — Knaffl-Lenz, E.: Arch. Exper. Path. u. Pharmakol. **135**, 259 (1928). — Link, F., u. Š. Kaprinayová: Čs. fysiologie **3**, 288 (1954). — Málek, J.: Čs. gynekologie **12**/26, 454 (1947). — Pharmacopoea Bohemoslovenica, Ed. sec. CXXIV., Praga 1954.

Dr. B. Mosinger, Pilsen, Kopernikgasse 49



Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 51—58 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Schulemann)

Eine tierexperimentelle Methode zur O_2- und CO_2-Bestimmung in der Atemluft nach Arbeit

Von
H. Friebel, A. v. Graevenitz und E. Vreden

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 17. Oktober 1956)

Unblutige Methoden zum speziellen Nachweis der pulmonalen und kardialen Insuffizienz von Versuchstieren stehen unseres Wissens noch nicht zur Verfügung. Dieser Mangel erschwert die Prüfung von Arzneimittel- und Giftwirkungen auf Herz, Lunge und peripheren Kreislauf im chronischen Versuch. Demgegenüber werden in der klinischen Medizin seit längerem Untersuchungsmethoden angewandt, die bei größtmöglicher Schonung der Versuchspersonen eine vielseitige Herz-, Lungen- und Kreislaufdiagnostik ermöglichen.

Im folgenden wird über Versuche, bei Laboratoriumstieren Funktionseinschränkungen des Herzens und der Lungen mit Hilfe des Arbeitsversuchs zu erfassen, berichtet. Besonders interessant schien es uns zu sein, derartige Methoden auf die physiologischen Verhältnisse von Kleintieren (Ratten, Meerschweinchen) abzustimmen. Wir konnten hierbei auf klinischen Erfahrungen aufbauen, die zuerst Hill und Lupton und später zahlreiche weitere Autoren veröffentlicht haben (Lit. bei Landen). Sie prüften den Gasstoffwechsel während der Arbeit und im unmittelbaren Anschluß daran. Wir haben im Tierversuch zunächst die letztgenannte Möglichkeit studiert und sind dabei von folgenden Vorstellungen ausgegangen:

Zu Beginn einer Arbeitsleistung dominiert in der Muskulatur der anaerobe Stoffwechsel solange, bis genügend Sauerstoff für eine aerobe Tätigkeit zur Verfügung gestellt wird. Die Sauerstoffversorgung wird durch die Gaswechselfunktion der Lungen und des Blutes und durch die Transportfunktion der Kreislauforgane gewährleistet. Im Normalfall ist es der Kreislauf, dessen Leistungsfähigkeit die Sauerstoffaufnahme begrenzt (Herbst); eine Begrenzung durch die Lungenfunktion tritt nur dann ein, wenn die Lunge erkrankt und der Atemgrenzwert stärker reduziert ist (Benzinger). Das Herzminutenvolumen kann nämlich bei schwerer Arbeit beim Menschen nur um das etwa Sechsfache seines Normalbetrages erhöht werden, die Sauerstoffausschöpfung in der Peripherie um das $2\frac{1}{2}$fache, wohingegen das Atemminutenvolumen eine etwa 30fache Vermehrung erfahren kann (Zaeper). Verminderungen der Arterialisierung, der Umlaufgeschwindigkeit und der Sauerstoffausschöpfung des Blutes führen zu Gewebshypoxie und -acidose. Die Kapazitätsminderung einer einzelnen der genannten Funktionen veranlaßt eine erhöhte

Tätigkeit der übigen (s. auch Zaeper). Bei weitergreifenden Störungen, wie sie bei schwereren Erkrankungen der Lungen und des Herzens auftreten, reichen jedoch derartige Kompensationsmechanismen nicht aus. In solchen Fällen kann die Sauerstoffnot der Gewebe höhere Grade erreichen, so daß nach der Arbeit die schon im Normalfall auftretende Sauerstoffschuld absolut oder relativ — bezogen auf die gesamte Sauerstoffaufnahme — vergrößert wird und zu ihrer Abgeltung ein längerer Zeitraum erforderlich ist. Hierbei wird vorausgesetzt, daß qualitativ und quantitativ gleichartige Arbeitsvorgänge bei verschiedenen Individuen etwa dieselben Sauerstoffmengen benötigen. Das Verhalten der Sauerstoffaufnahme in der Erholungsphase müßte demnach Rückschlüsse auf die Größe der Sauerstoffschuld zulassen (Meakins u. Long).

Die Bestimmung des Erholungsumsatzes erfordert ein Gerät für den Arbeitsversuch und eines für die Gasstoffwechselmessung.

Arbeitsversuch. Unter den bisher bekannten Methoden zur Leistungsprüfung am Kleintier fanden wir keine, die sich für unsere Zwecke eignete. Der Schwimmversuch (Kirch u. Grünbauer, Kuschinsky, Frank, Fleisch, Sarre u. Moskopf) strapaziert die Versuchstiere stark und durchnäßt sie. Erkältung der Tiere im luftdurchströmten Stoffwechselkäfig und störende Wasserdampfkondensation im Meßgerät sind die Folgen; die an der Körperoberfläche entstehende Verdunstungskälte beeinflußt die Verbrennungsvorgänge im Organismus. - Beim Arbeitsversuch im Laufrad (Secher, Korenyi u. Hajdu, Kuschinsky, Hort), der in Vorversuchen erprobt wurde, ließen sich die meisten Versuchstiere trotz griffiger Beschaffenheit der Lauffläche nach kürzerer oder längerer Drehzeit passiv mitbewegen. Über gleichartige Beobachtungen berichten Knoll u. Fronius. Wir mußten daher günstigere Bedingungen schaffen.

Der Konstruktion unserer Apparatur liegt eine Idee aus den Laboratorien der Hoffmann-La Roche-AG zugrunde. Die Tiere laufen auf dem oberen horizontalen Teil eines endlosen Bandes. Ein in gleicher Ebene gelegenes Metallgitter gibt ihnen zwar eine Rückzugsmöglichkeit von der bewegten Fläche, doch ist es elektrisch aufgeladen und wird nur bei Erschöpfung der Tiere zum Ausruhen benutzt.

Das gummierte Band, 21 cm breit und 2 m lang, ist über 2 Walzen von je 10 cm Durchmesser gespannt. An der in der Transportrichtung gelegenen Schmalseite des Bandes befindet sich das Gitter aus 20 parallel zueinander und zur Laufrichtung gestellten Messingstäben (20 cm lang, 3 mm Durchmesser). Sie liegen mit dem einen kugelförmig gestalteten Ende federnd dem Band auf, mit dem anderen sind sie in eine Plexiglasplatte eingeschraubt. Diese Einrichtung macht ein Einklemmen von Pfoten oder Schwanz unmöglich. Geradzahlige bzw. ungeradzahlige Stäbe sind mit den Polen eines Reizgenerators verbunden. Das Band wird von einem Elektromotor über ein Vorgelege und eine der Walzen bewegt (Umlaufgeschwindigkeit stufenlos regulierbar von 12—48 m/min). Geringere Geschwindigkeiten bzw. ein völliges Abbremsen und Rückdrehen des Laufbandes werden durch Bedienung eines Handrades, das auf einer Walzenachse angebracht ist, erreicht. Tachometer und Kilometerzähler zur Überwachung der vom Tier zurückgelegten Strecke sind mit der Walzenachse verbunden. Verschalung des Gerätes mit Holz und Plexiglas. Die Deckplatte kann aufgeklappt werden.

Gesunde Ratten bzw. Meerschweinchen lernten in der Regel schon beim ersten Laufversuch, das Gitter zu vermeiden und sich dem Tempo des Laufbandes anzupassen. Zunächst wurden sie mit Hilfe des Handrades langsam zum Gitter hinbewegt; wenn sie dort mehrmals einen

Schlag erhalten hatten, liefen sie mit gleichbleibender Geschwindigkeit, ohne das Gitter zu berühren. Nur etwa 10% der von uns verwandten Ratten erlernten das Laufen nicht.

Gasstoffwechselmessung. Zur kontinuierlichen Messung von O_2-Aufnahme und CO_2-Abgabe wurde das Diaferometer nach NOYONS[1] gewählt, weil es der Forderung von BAHNER, Konzentrationsänderungen von 0,1 cm³/min mit einem erlaubten Fehler von etwa ± 2% anzuzeigen, entspricht. Es mißt die prozentuale Änderung in der Zusammensetzung eines Gasgemisches am Kühleffekt auf die Drähte von WHEATSTONEschen Brücken. Das handelsübliche Gerät mit gedämpften Galvanometern wurde durch folgende Änderungen den Erfordernissen des Kleintierversuchs angepaßt: Die Luft strömt durch ein zylindrisches Glasgefäß (15 cm lang, 9 cm Durchmesser), in dem sich das Versuchstier befindet; eine vorgelagerte Drahtspirale verhindert das Abdrosseln des Luftstromes durch den Tierkörper. Das Gefäß und das Manometer zur Registrierung der pro Minute durchströmenden Luftmenge wurde über der Schalttafel des Diaferometers so angebracht, daß sie in einem Blickfeld liegen. Der zum Gerät gehörige Windkessel wurde entfernt; das Rohrleitungssystem so kurz wie möglich gehalten, um zu erreichen, daß die vom Tier herrührenden Veränderungen der Durchströmungsluft soweit wie möglich nicht nur quantitativ, sondern auch in zeitgerechter Aufeinanderfolge wiedergegeben werden. Gaskonzentrationsschwankungen, die im Glaszylinder auftreten, machten sich nunmehr im Anzeigersystem von CO_2 mit einer Latenz von etwa 40 sec, für O_2 von etwa 55 sec erstmalig bemerkbar. Der Höhepunkt des Ausschlages wurde nach 2½ min erreicht. Die Durchströmungsgröße im Hauptstrom betrug 1 l/min ± 1%. Sie wurde so gewählt, daß der CO_2-Gehalt der Durchströmungsluft möglichst nicht über 1% hinausging, da bei höheren Konzentrationen die Atmung merkbar beeinflußt wird (HECHT). Die höchste und nur einmalig gemessene CO_2-Konzentration nach dem Arbeitsversuch betrug 1,1%. — Raumtemperatur 21—22°; Luftdruck 750—760 mm.

Bei gelegentlichen Grundumsatzbestimmungen wurde die Gasstoffwechselprüfung in der sogenannten thermischen Neutralzone, d. h. bei minimaler Wärmeabgabe des Versuchstiers vorgenommen. In diesen Fällen wurde die Durchströmungsluft auf zwei Wegen erwärmt. Beim Einströmen wurde sie von einer 40 Watt-Osrambirne so weit erwärmt, daß sie — bei der Verwendung von Ratten — mit etwa 28° C den Tierkäfig erreichte. Wärmeverlust im Glaskäfig ließ sich durch Bestrahlung mit einer weiteren 40 Watt-Lampe verhindern. Temperaturkontrolle im Käfig mit ANSCHÜTZ-Thermometer. Die Erwärmung des Käfigs durch eine Lichtquelle wird für unbedenklich gehalten, da LOTZ nachgewiesen hat, daß Lichtstrahlen den Stoffwechsel nicht verändern. In den anschließenden Rohrleitungen kühlte sich die Luft wieder so weit ab, daß sie beim Erreichen der WHEATSTONEschen Brücken Raumtemperatur angenommen hatte.

Versuchstierhaltung. Ratten wurden einzeln oder paarweise in Töpfen gehalten (Stalltemp. 20—21° C). Tägliche Fütterung mit 3 Cakes Rattenfutter[2] pro Tier, Leitungswasser ad lib. Unter diesen Bedingungen nahmen 180—300 g schwere weibliche Ratten an Gewicht weder zu noch ab. Versuchszeiten zwischen 9 und 18 Uhr; bei Grundumsatzbestimmungen zwischen 10 und 18 Uhr (Begründung bei HORST u. Mitarb.). Veränderungen der Sauerstoffaufnahme, die cyclusbedingt bei weiblichen Ratten auftreten (nach LEE bis zu 12%), wurden nicht berücksichtigt, da derartige Differenzen bei Reihenversuchen weitgehend ausgeglichen werden.

[1] Hersteller: Fa. Kipp, Delft.

[2] Hersteller: Fa. Latz, Euskirchen.

Versuchsverlauf. In drei Vorversuchen von jeweils 5 min mußten die Tiere 18, 24 und schließlich 30 m/min laufen. Hierbei erlernten sie entweder eine ökonomische Lauftechnik oder wurden ausgesondert.

Systematisches Training wurde vermieden, um einer Zunahme der maximal möglichen Sauerstoffaufnahme und einer erhöhten Toleranz gegenüber der Sauerstoffschuld vorzubeugen (Rossier u. Mitarb.). Auf Grundumsatzbedingungen haben wir verzichtet, da sich einerseits alle Tiere im Stall und Versuchsraum unter annähernd gleichen Umwelt- und Ernährungsbedingungen befanden, andererseits von den Tieren niemals vollständige Muskelruhe eingehalten wird. Im Hauptversuch wurde jedem Tier dieselbe Laufleistung abverlangt (250 m in 8 min 20 sec).

Wir gingen dabei von der Erwartung aus, daß unter diesen Bedingungen wenigstens bei gesunden Tieren der Zustand der konstanten Arbeitsatmung (steadey state der Atmung nach Zaeper) erreicht wird. Die Ergebnisse neuerer, noch unveröffentlichter Versuche rechtfertigen diese Annahme nachträglich.

Nach dem Lauf wurden die Tiere sofort (maximal 10 sec) in den Stoffwechselkäfig gesetzt. Die Zeigerausschläge wurden in den ersten 4—6 min alle 30 sec, später alle 60 sec abgelesen; zunächst an der CO_2-Skala, 15 sec später an der O_2-Skala. Letzte Ablesung in der 38. min. Kontrolle der Eichwerte (Galvanometer-Nullpunkte) vor Versuchsbeginn (0. bis 2. min), nach der 19. und 38. min.

Auswertung der Protokolle. Die beim Einzelversuch anfallenden Eichwerte wurden zu einer Eichkurve (Waagerechte = Zeit, Senkrechte = Eichwert) verbunden, die in der Regel als Gerade mit geringer Neigung verläuft. Die Abweichung von der Horizontalen läßt sich für jeden Punkt nach dem Strahlensatz berechnen. Die durch das Tier bewirkten Zeigerausschläge wurden auf die Eichkurve bezogen. Die Berechnung der wahren Gaskonzentrationsänderungen (ΔCO_2 und ΔO_2) erfolgte nach der Anweisung des Geräteherstellers. Die pro Minute ein- bzw. ausgeatmeten Gasvolumina wurden anschließend durch Einbeziehen der Durchströmungsmenge und Reduktion auf die Normalvolumina ermittelt. Nach dem Vorschlag von Noach wurden diese Werte auf die Körperoberfläche des Einzeltieres bezogen.

Sie beträgt nach Ferguson für die Ratte $0 = 12{,}54 \cdot w^{0{,}6}$ (w = Tiergewicht in Gramm). Das pro Minute und Quadratzentimeter Tieroberfläche gewechselte Gasvolumen ist

$$G = \frac{\mu \cdot S}{O} \cdot \frac{\Delta C}{100} \text{ in Liter/Quadratzentimeter/Minuten.}$$

Hierbei bedeuten μ das Verhältnis des Normalvolumens zum Volumen des Gases bei den im Versuchsraum herrschenden Bedingungen, S die Durchströmungsgröße in Liter/Minute, O die Tieroberfläche in Quadratzentimeter und ΔC die prozentuale Gaskonzentrationsänderung in der Durchströmungsluft.

Zur Einengung der individuellen Streuung wurden diese Werte von mehreren Einzeltieren zu Mittelwerten zusammengefaßt. Aus ihnen haben wir nach dem Vorgehen von Hill, Long u. Lupton Mittelwertkurven gebildet (Waagerechte = Ablesezeit, Senkrechte = Gaswechselwerte). Die Latenz, mit der Gaskonzentrationsänderungen vom Gerät

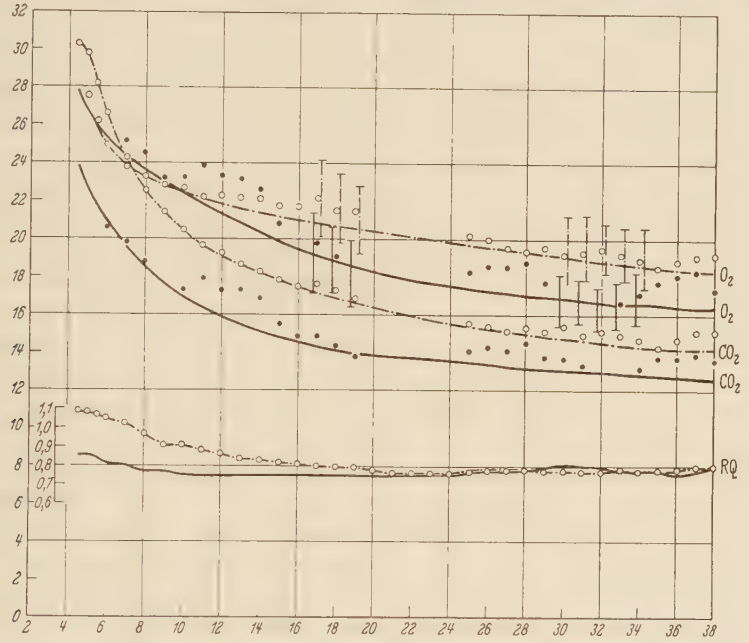


Abb. 1. O_2-Aufnahme und CO_2-Abgabe bei gesunden und silikosekranken Ratten. Waagerechte: Versuchsdauer in Minuten, Senkrechte: Gaswechselwerte für O_2 bzw. CO_2 in Kubikmillimeter/Quadratzentimeter/Minuten bzw. Größe des *RQ*. Die berechneten Gaswechselwerte sind durch Punkte bzw. Kreise angegeben. Die Kurven kennzeichnen Stoffwechselminima; —— Normaltiere, —·—· Silikosetiere. Bei O_2-Werten gesunder und kranker Tiere, die statistisch different sind, ist der doppelte mittlere Fehler des Mittelwertes eingezeichnet

angezeigt wurden, blieb also unberücksichtigt. Beim Vergleich der Mittelwerte zweier Meßreihen erfolgte die Differenzberechnung nach der *t*-Methode (Einzelheiten bei Linder). Mindestdifferenz für statistische Signifikanz: 95,45% Wahrscheinlichkeit[1].

Als *Beispiel* für die Anwendung unserer Methodik wird das Verhalten des Gasstoffwechsels bei 2 Gruppen von je 20 Ratten vergleichend dargestellt. Es handelt sich um gleichaltrige Tiere, die unter übereinstimmenden Bedingungen gehalten wurden. Die Angehörigen der einen Gruppe hatten 6 Monate vor Ausführung der Messungen eine intratracheale Injektion einer Quarzaufschwemmung erhalten; sie befanden sich

[1] Herrn Prof. Dr. W. Thimm (Institut für angewandte Mathematik der Universität Bonn) danken wir für die Beratung.

im Zustand fortschreitender Silikose, die bei Anwendung dieser Technik erfahrungsgemäß im 9. Monat nach der Injektion ihren Höhepunkt erreicht, jedoch nicht bei allen Tieren in gleichem Maße ausgeprägt ist[1]. Die Tiere der anderen Gruppe waren unbehandelt. Die Abb. 1 zeigt, daß bei den silikosekranken Tieren die O_2-Aufnahme und CO_2-Abgabe erhöht ist, während der zuvor bestimmte Grundumsatz bei beiden Gruppen übereinstimmte.

Diskussion

Kleintiere leisten die für den Versuch erforderliche Arbeit nicht freiwillig. Ihre Angst, das aufgeladene Gitter zu berühren —, d. h. psychische Erregung — spornt sie an. Dieser psychische Faktor hat erhebliche, aber nicht näher bestimmbare Auswirkungen auf den Stoffwechsel. Besondere Beachtung verdient er bei kranken Tieren, die nur mit verstärkter Nachhilfe zum Laufen zu bewegen sind. Bei diesen Voraussetzungen gilt die anfangs begründete Annahme, daß erhöhter Sauerstoffverbrauch nach geleisteter Arbeit Rückschlüsse auf eine arbeitsbedingte Sauerstoffschuld zuläßt, nicht uneingeschränkt. Ein derartiger Faktor dürfte auch die Ursache dafür sein, daß das Kollektiv der kranken Tiere unmittelbar nach Arbeitsende ebensoviel Sauerstoff aufnimmt wie das der gesunden, und daß — bei Anwendung unseres aus der Klinik übernommenen Auswertungsverfahrens — die gesicherte Differenz erst später auftritt und länger anhält, als es vom Menschen her (s. Gollwitzer-Meier u. Simonson) bekannt ist. Würde man andere Rechenverfahren (z. B. die prozentuale Änderung des Sauerstoffverbrauchs gegenüber dem Maximum bzw. Minimum) anwenden, so ließe sich zu Versuchsbeginn eine Erhöhung der Sauerstoffaufnahme bei dem Silikose-Kollektiv nachweisen. Da nur die Größe und Dauer der Differenz für die Bewertung des Krankheitszustandes maßgeblich ist, haben wir das bekanntere Auswertungsverfahren bevorzugt.

Weitere Faktoren, welche es erschweren, die Beziehung zwischen Sauerstoffschuld und Krankheitszustand exakt zu belegen, sind:

1. Die Unruhe der Tiere. In einigen orientierenden Versuchen wurden den Tieren 25—30 mg/kg Natr. phenyläthylbarbitur. 15 min vor Arbeitsbeginn s.c. verabreicht, um die Bewegungen (Putzen, Schnüffeln, Umdrehen) auszuschalten, die trotz Gewöhnung an den Käfig auftraten. Obwohl diese Dosis ausreicht, um den Stoffwechsel — in unerwünschter Weise — zu senken, gelang es nicht, den Verlauf der Gaswechselkurven vollständig zu glätten. Sie ließen vielmehr erkennen, daß neben unterdrückbaren, unregelmäßig auftretenden Spontanbewegungen noch unbeeinflußbare kurzdauernde Bewegungsschübe auftreten (s. auch Szymanski, Oberdisse), die den wellenförmigen Verlauf der Kurven bedingen. Zur Differenzberechnung können nur diejenigen Punkte der Kurven herangezogen werden, welche den größtmöglichen Ruhezustand des Kollektivs charakterisieren, d. h. Minima des O_2-Verbrauchs bzw. CO_2-Ausstoßes darstellen.

[1] Die Präparierung der Tiere verdanken wir Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Lüchtrath (Pathologisches Institut der Universität Bonn).

2. Die Latenz des Gerätes. Sie ist von der Größe der Zuführungswege und der Meßzellen, von der Strömungsgeschwindigkeit im Nebenstrom und von der Dämpfung der Galvanometer abhängig (vgl. Göpfert u. Henneberg); sie behindert eine bis in die Einzelheiten gehende Anzeige; man erhält vielmehr die Durchschnittswerte aus einer größeren Anzahl von Meßperioden in Abhängigkeit von der Latenz.

3. Das Umsetzen der Tiere vom Arbeitsgerät in den Stoffwechselkäfig. Bei Tieren, die ohne vorausgehende Arbeitsleistung in den Käfig gesetzt wurden, zeigte sich regelmäßig zunächst ein vermehrter Sauerstoffverbrauch, der erst nach mehreren Minuten abklang. Für vergleichende Untersuchungen an kranken und gesunden Tierkollektiven dürfte aber dieser Faktor, der sich bei allen Tieren in annähernd gleichem Maße bemerkbar machen wird, belanglos sein.

Geringere Schwierigkeiten bereitet die Auswertung der CO_2-Kurven von gesunden und kranken Tieren. Fast zu jedem Zeitpunkt der Registrierperiode besteht eine gesicherte Differenz zwischen beiden. Vermutlich resultiert sie ebenfalls nicht nur aus der krankheitsbedingten Acidose mit Hyperventilation, sondern auch aus der durch Stimulation bedingten Hyperpnoe. Theoretisch muß es möglich sein, diese Fehler der Methodik durch Atemvolumbestimmungen während der Gaswechselmessung einzuengen (Zaeper, Klosterkötter u. Künzer); in der Praxis gelingt es aber nicht, die Tiere mit einer Atemmaske arbeiten zu lassen. Der störende Einfluß der genannten Faktoren ist begrenzt; denn die von uns ermittelten Ergebnisse ähneln durchaus den von Hebestreit sowie den von Gollwitzer-Meier u. Simonson am Menschen gewonnenen Resultaten (z. B. anfänglicher Abfall der CO_2- und O_2-Konzentrationen beim normalen, erhöhte CO_2-Abatmung bei kranken Individuen). —

Der Anwendungsbereich der Methode erstreckt sich auf subakut bis chronisch verlaufende Erkrankungen im Bereich der Lungen und des Kreislaufs, wie sie z. B. bei toxikologischen Untersuchungen hervorgerufen werden. Es gelingt, diese Zustände ohne Schädigung der Tiere zu objektivieren, bzw. zunächst die Funktionseinschränkung zu bestimmen und dann das Tier zu opfern, so daß der anatomische Befund durch den funktionellen ergänzt wird.

Das Verfahren wird als Zwischenergebnis ausbaufähiger und weiterreichender Entwicklungsarbeit bekanntgegeben.

Summary

In order to determine the metabolism during the recovery period in small laboratory animals they are first made to perform work on a running belt. Then the estimation of gaseous metabolism with the help of the Diaferometer after Noyons is carried out. It has been proved by this method that normal rats and those suffering from silicosis have different Recovery-metabolism.

Herrn Mechanikermeister J. Kurschilgen danken wir für den Bau des Arbeitsgerätes; Fräulein G. Jamann und Herrn N. Patel für ihre Mitarbeit bei den Versuchen.

Literatur

Bahner, F.: Pflügers Arch. **250**, 521 (1948). — Benzinger, T.: Erg. Physiol. **40**, 1 (1938). — Ferguson, J. K. W.: zit. nach Noach. — Fleisch, A.: Schweiz. med. Wschr. **1950**, 203. — Frank, A.: Z. exper. Med. **115**, 312 (1950). — Gollwitzer-Meier, K., u. E. Simonson: Z. exper. Med. **71**, 329 (1930). — Göpfert, H., u. U. Henneberg: Pflügers Arch. **263**, 1 (1956). — Hebestreit, H.: Pflügers Arch. **222**, 738 (1929). — Hecht, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **166**, 432 (1932). — Herbst, R.: Dtsch. Arch. klin. Med. **162**, 34 (1928). — Hill, A. V., u. H. Lupton: Quart. J. Med. **16**, 135 (1923). — Hill, A. V., C. N. H. Long and H. Lupton: Proc. Roy. Soc. Med. **96**, 438 (1924); **97**, 84 (1924). — Horst, K., L. B. Mendel u. F. G. Benedict: J. Nutrit **8**, 139 (1934). — Hort, W.: Arch. path. Anat. (Berlin) **320**, 197 (1951). — Kirch, E., u. W. Grünbauer: Beitr. path. Anat. **100**, 354 (1938). — Knoll, W., u. H. Fronius: Arbeitsphysiologie **6**, 295 (1933). — Korenyi, Z., u. J. Hajdu: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 641 (1943). — Kuschinsky, G.: Klin. Wschr. **1946/47**, 468 und 502. — Landen, H.: Die funktionelle Beurteilung des Lungen- und Herzkranken. Darmstadt: Th. Steinkopff 1955. — Lee, M. O.: Amer. J. Physiol. **81**, 492 (1927). — Linder, A.: Statistische Methoden. Basel 1951. — Lotz, R. G. A.: Z. vergl. Physiol. **32**, 228 (1950). — Meakins, J. C., and C. N. H. Long: J. Clin. Invest. **4**, 273 (1927). — Noach, E. L.: Acta physiol. et pharmacol. Neerl. (Amsterd.) **3**, 95 (1953). — Noyons, A. K. M.: Ann. de Physiol. **13**, 909 (1937). — Oberdisse, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **162**, 150 (1931). — Rossier, P. H., A. Bühlmann u. K. Wiesinger: Physiologie und Pathophysiologie der Atmung. Berlin: Springer 1956. — Sarre, H., u. E. Moskopf: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforsch. **19**, 283 (1953). — Secher, K.: Z. exper. Med. **14**, 113 (1921). — Szymanski, J.: Pflügers Arch. **158**, 379 (1914). — Zaeper, G.: Dtsch. Arch. klin. Med. **186**, 1 (1940). — Zaeper, G., W. Klosterkötter u. W. Künzer: Z. exper. Med. **110**, 226 (1942).

Doz. Dr. med. H. Friebel, Bonn, Pharmakologisches Institut der Universität Reuterstr. 2b

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 59—72 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Kiel

Beitrag zur Bestimmung der LD_{50} und der Berechnung ihrer Fehlerbreite

Von
Behrend Behrens und Lucie Schlosser

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. Oktober 1956)

Ausgang der folgenden Betrachtung ist eine Veröffentlichung von W. Wilbrandt (1952) mit dem Titel „Das Behrenssche Verfahren zur Berechnung der LD_{50}". In diesem Aufsatz wird an Hand einiger willkürlicher extrem gewählter Zahlenbeispiele gezeigt, daß das von dem einen von uns angegebene Verfahren dann zu unrichtigen Ergebnissen führen muß, wenn Versuche berechnet werden, bei denen sowohl der Abstand der Tiergruppen als auch die Zahl der Tiere in den Gruppen nicht absolut gleich sind. Diese Feststellung erscheint insofern überflüssig, als das sogenannte Behrenssche Auswertungs-Verfahren ausdrücklich nur dann anwendbar ist, wenn diese Bedingungen von vornherein eingehalten sind. In der ersten Arbeit zu diesem Thema (Behrens 1929) wird S. 251 ausdrücklich gesagt: „Unter der Voraussetzung, daß es sich um ein stetiges Kollektiv handelt, daß in den einzelnen Gruppen *gleichviel* Tiere angesetzt werden und daß die Gruppenabstände *gleich groß* sind (arithmetische Reihe), ist zu erwarten, daß die Gesamtzahl der bei niedrigen Dosen Gestorbenen gleich ist derjenigen der Überlebenden bei höheren Dosen vom erwarteten Wert aus betrachtet. Selbstverständlich müssen wir die gesamte Ausdehnung unseres Kollektivs mit den Gruppen erfassen. Wenn diese Bedingungen erfüllt sind, dürfen wir sagen: . . ." Bei Betrachtung der in dieser Arbeit auf den folgenden Seiten gemachten Ausführungen ist es klar, daß mit dem von Behrens angegebenen Vorschlag letztlich Flächen bestimmt werden, eine Bestimmung, die sich bei Einhaltung der oben genannten Bedingungen in der Weise vereinfachen läßt, daß von der niedersten Dose beginnend alle toten Tiere zusammengezählt werden und gleichzeitig von der höchsten Dose beginnend alle Überlebenden und die Dosis aufgesucht wird, bei der die beiden Summen gleich sind.

Das von Behrens angegebene Verfahren ließe sich natürlich auch anwenden, wenn die oben angegebenen Bedingungen nicht erfüllt sind.

Dann müßte aber — wie in der zitierten Arbeit schon angegeben — die Zahl der überlebenden bzw. gestorbenen Tiere in Prozent ausgedrückt werden und bei ungleichen Gruppenabständen die zu addierenden Zahlen jeweils mit den dazugehörigen Gruppenabständen multipliziert werden, um zu vergleichbaren Flächenwerten zu kommen. Ein solches Vorgehen wäre umständlich. Es läßt sich weitgehend vereinfachen durch den zuerst von Kärber (1931) gemachten Rechnungsvorschlag, der ebenfalls zur Voraussetzung hat, daß es sich bei dem jeweiligen Versuch um eine Normalverteilung handelt. Auch hier wird der Zentralwert aus der Fläche unter der Mortalitätskurve errechnet. Weitere Einzelheiten s. Behrens, Gros u. Hildebrandt (1932), sowie Behrens u. Kärber (1935).

Es macht den Eindruck, daß derselbe Irrtum, der Wilbrandt zu seinem Aufsatz veranlaßt hat, gelegentlich auch von anderer Seite gemacht wurde, d. h. daß Auswertungsergebnisse in der angegebenen Weise berechnet wurden, die von Versuchen stammten, bei denen auf die Gleichheit oder wenigstens annähernde Gleichheit der Gruppenabstände und der Tierzahlen in der Gruppe nicht geachtet wurde. Dies ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß in dem bekannten Buch von Burn (1937), der das Behrenssche Verfahren eingehender schildert, auf diese Vorbedingungen nicht ausdrücklich hingewiesen wurde, weil sie wohl als selbstverständlich erachtet wurden (in der neueren Auflage ist das Verfahren nicht mehr erwähnt). Auch die Ausführungen von Gaddum (1953) S. 118 zu der Methode von Behrens beruhen offensichtlich auf demselben Mißverständnis. Auch dieses Verfahren ist, wie die Berechnung nach Kärber, ein Flächenverfahren, wie van der Waerden (1940) diese Methoden im Gegensatz zu den heute als Probitverfahren bekannten Verfahren bezeichnet. Wenn es sich um ein Kollektiv mit normaler Verteilung handelt, muß sowohl nach der Berechnung nach Behrens als auch nach Kärber das gleiche Resultat erhalten werden, auch die Streuung der erhaltenen Ergebnisse kann nicht voneinander differieren.

Ein Unterschied zwischen der Berechnung nach Behrens bzw. Kärber besteht nur insofern als in einem Fall von den Klassengrenzen, in dem anderen Fall von den Klassenmitten ausgegangen wird. Bei der Berechnung nach Kärber werden die wechselnden Streuungen der einzelnen Meßpunkte über den Verlauf der gesamten Mortalitätskurve ausgeglichen, während dies bei Behrens nur innerhalb der beiden Hälften des Kollektivs der Fall ist. In der Praxis ergeben sich deshalb bei Berechnung nach den beiden Verfahren gelegentlich geringfügige Abweichungen der errechneten Mittelwerte.

Die Verhältnisse mögen noch einmal durch die folgende Zeichnung veranschaulicht werden (Abb. 1).

In der Abb. A sind die Flächen schraffiert dargestellt, die der Berechnung nach Behrens zugrunde gelegt werden, in der Abb. B die Fläche, die der Berechnung nach Kärber gilt. In beiden Fällen werden die Flächen aus denselben Versuchsergebnissen bestimmt. Ob nun nach Kärber die Strecke bc berechnet wird oder ob nach Behrens der Punkt (Dosis) ermittelt wird, von dem aus gesehen die Fläche F_1 und F_2 gleich groß sind bzw. an dem ab gleich bc ist, kann — immer unter der Voraussetzung, daß es sich um eine binomiale Verteilung handelt — nur zu

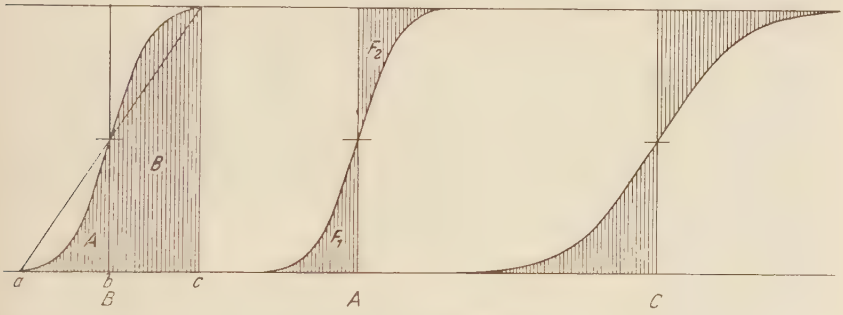


Abb. 1. Dosis-Wirkungskurven

demselben Ergebnis führen. Die Teilfläche A bei Kärber ist mit der Fläche F_1 bei Behrens identisch, die Teilfläche B ist durch Subtraktion der Fläche F_2 von $100 \cdot bc$ zu erhalten.

Es bedarf wohl keines weiteren Beweises, um darzutun, daß beim Vorliegen einer Normalverteilung die Ergebnisse nach den beiden Methoden dieselben sind, die nur durch andersartige Berechnung gewonnen werden. Im allgemeinen wird man der Berechnung mit der Kärberschen Formel den Vorzug geben, weil dies Verfahren rechnerisch bequemer zu handhaben ist, es sei denn, daß man sich die Berechnung durch die Anordnung des Versuches in der Weise erleichtert, wie es von Behrens in der oben zitierten Arbeit angegeben wurde.

Das vereinfachte Rechenverfahren nach Behrens hat aber einen Nachteil insofern, als es bis jetzt kein einfaches Verfahren gab, die Streuung der Auswertungsergebnisse in befriedigender Weise direkt zu berechnen. Heute hält man die Bestimmung der Streuung, um Signifikanzrechnungen durchführen zu können, für unerläßlich. Vor allem die sogenannten Probitverfahren sind in dieser Richtung sehr gut ausgearbeitet. Für andere Flächenverfahren — auch für die Berechnung nach Kärber — sind Versuche, die Streuung des Mittelwerts zu berechnen, angestellt worden. Bei einem von Gaddum (1933) angegebenen Verfahren

ist die Kenntnis der Streuung des Tiermaterials Voraussetzung. Dies ist natürlich selten der Fall.

Ein brauchbarer Weg zur Streuungsberechnung ist für die Kärber-sche Methode von van der Waerden aufgezeigt worden. Die Berechnung des Mittelwertes — Berechnung der Fläche — erfolgt auf etwas anderem Wege wie ursprünglich von Kärber angegeben (s. auch Behrens, Gros u. Hildebrandt). Das Verfahren zur Berechnung der Streuung ist mit einem verhältnismäßig geringen Rechenaufwand durchzuführen. Es wird von van der Waerden gezeigt, daß die so auf viel einfacherem Wege erhaltenen Resultate den Ergebnissen der raffinierteren englischen Rechenverfahren an Genauigkeit nicht nachstehen.

Wir haben uns nun die Frage vorgelegt, ob sich nicht auch bei der Berechnung nach Behrens, also aus den Flächen F_1 und F_2, die Streuung errechnen ließe, und ob vielleicht auch für die Methode von Kärber eine weitere Vereinfachung noch zu erzielen wäre. Wie bei den Probitverfahren ist auch bei der Berechnung nach van der Waerden das Quadrieren der Gruppenabstände lästig und zeitraubend, vor allem, wenn eine log-normale Verteilung zugrunde gelegt wird.

Nach einer Reihe von Versuchen, die zu keinem befriedigenden Ergebnis geführt haben, sind wir zu einem Verfahren gekommen, das sich durch Einfachheit und leichte Verständlichkeit auszeichnet. Auch glauben wir, daß es bezüglich Genauigkeit umständlicheren Verfahren bei vernünftiger Anordnung der Versuche gleichkommt.

Das Prinzip unserer Methode ist die Tatsache, daß aus den Flächen F_1 und F_2 der Abb. A sich die Streuung des Tiermaterials errechnen läßt. Daß die Größe dieser beiden Flächen von der Streuung des jeweiligen Tiermaterials (σ) abhängig ist, ist leicht einzusehen. Die Abb. A zeigt die Größe der Fläche bei einem σ des Tiermaterials von $\pm$ 5 und in der Abb. C von $\pm$ 10%.

Die Flächen F_1 und F_2 sind leicht aus den experimentellen Daten zu errechnen, es sind dieselben Flächen, die der eine von uns zur Bestimmung des Mittelwertes benutzt hat [Summe (Gruppenabstand · Mortalitätsprozent bzw. Überlebendenprozent)]. Die beiden Flächen sind für diese Berechnung im Gegensatz zu anderen Größen, die auch von der Streuung des Kollektivs abhängig sind, besonders geeignet. Die Bestimmung der Grenzwerte eines Kollektivs ist nur ungenau möglich; die zugehörigen Werte sind aber bei diesen Flächen so klein, daß die hierdurch entstehenden Fehler auf das Endresultat keinen Einfluß haben.

Es läßt sich berechnen, daß bei einem Kollektiv mit dem $\sigma = 1$, wenn die Mortalitäten in Prozent ausgedrückt sind, die Größe der beiden Flächen zusammen rund 81 (σ) beträgt. Der Flächeninhalt ändert sich proportional dem σ. Wenn die Flächengröße bekannt ist, erhält man dementsprechend durch Division durch 81 den entsprechenden σ-Wert.

Werden diese Flächen aus einem großen Tiermaterial errechnet, so erhält man auf diese Art den Wert der Streuung des Tiermaterials.

Ist das Tiermaterial klein, so ist der erhaltene Wert natürlich ungenau. Es zeigt sich nun, daß man für die vorliegende Fragestellung diesen Wert für den bei der Fehlerrechnung üblichen Begriff $\sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n \quad l}}$ einsetzen kann. Bei einem kleinen Tiermaterial ergibt sich eine Schwierigkeit, die darin besteht, daß der gesamte Bereich des Kollektivs mit den Gruppen nicht erfaßt wird. Sind z. B. nur 5 Tiere in einer Gruppe vorhanden, so kann eine kleinere Mortalitätsprozentzahl als 20% nicht erfaßt werden. Dementsprechend darf die Gesamtfläche (Faktor 81) nicht in die Rechnung eingesetzt werden.

Es war nun zu prüfen, ob bei einer Begrenzung der Fläche noch brauchbare Werte zu erhalten sind, bzw. ob die anzubringende Korrektur das Ergebnis so wenig beeinflußt, daß innerhalb gewisser Grenzen ein konstanter Wert eingesetzt werden kann. Wir sind zu dem Ergebnis gekommen, daß dies im Rahmen der für Toxicitätsbestimmungen erforderlichen Genauigkeit sehr gut möglich ist. Begrenzt man den Flächenfaktor auf 1,5 (Normaläquivalent), was einer Mortalität von 6,7 bzw. 93,3% entsprechen würde, so erhält man bei der Verwendung von 5—50 Tieren recht exakte Werte. Der Flächenfaktor beträgt dann 75 (anstatt 81). Durch eine größere Anzahl von Versuchen an einem berechneten Kollektiv haben wir uns von der Richtigkeit und Brauchbarkeit dieses Faktors überzeugt (wobei natürlich der gleich zu besprechende Umrechnungsfaktor Streuung des Zentralwertes zur Streuung des arithmetischen Mittels berücksichtigt war).

Es ist zu bedenken, daß das eben Gesagte für die Streuungsberechnung eines arithmetischen Mittels gilt. In unseren Versuchen wird aber in Wirklichkeit der Zentralwert eines Kollektivs bestimmt, mit dem das arithmetische Mittel allerdings identisch ist, wenn es sich um ein Kollektiv mit normaler Verteilung handelt. Die Beziehung der Streuung des arithmetischen Mittels zu der des entsprechenden Zentralwertes sind für Kollektive von sehr großem Tiermaterial zu berechnen und bekannt $\left(\sqrt{\frac{2}{\pi}}\right)$ Für kleinere Tierzahlen scheint eine Berechnung nicht möglich. Auch in der Literatur haben wir keine Angaben finden können. Durch entsprechendes Ausprobieren mit errechneten Kollektiven konnte Meiisel in unserem Institut feststellen, daß selbst bei sehr kleinem Tiermaterial das Verhältnis dieser beiden Streuungswerte (1:0,83) sich auf jeden Fall nicht merklich ändert. Diesen Faktor haben wir in die Rechnung einzusetzen, d. h. das erhaltene Resultat wäre noch durch 0,83 zu dividieren.

Um den gesuchten Wert (Streuung des Mittelwertes) zu erhalten, ist es nun nötig, den so erhaltenen Wert für σ durch die Wurzel der

Tierzahl zu dividieren. Eine Schwierigkeit ist, die richtige Tierzahl zu ermitteln.

Daß die Tiere, die den Gruppen mit der Mortalität 0 und 100% angehören, nicht mit zu bewerten sind, leuchtet ein. Werden alle Tiere, die in den Gruppen zwischen 0 und 100% in den Versuch genommen waren, in die Rechnung eingesetzt, so erhält man im allgemeinen angenähert brauchbare Werte. Diese sind aber etwas zu günstig, besonders dann, wenn sich die Versuchstiere in den Randgruppen häufen. Es ergibt sich hier dieselbe Problemstellung, die bei der Berechnung der Streuung nach dem Probit-Verfahren zur Einführung eines Bewertungskoeffizienten (Weightkoeff.) führte. Dies ist durchaus verständlich. Dort wo die Mortalitätskurve flacher verläuft, ist auch dann, wenn die Mortalitätsprozente in diesen Gruppen mit gleicher Genauigkeit bestimmt werden, der Punkt auf der Kurve weniger scharf bestimmt (flacher Kurvenverlauf). Die Tiere in den Randgruppen haben also nicht das gleiche Gewicht wie die in der Nähe der LD_{50}. Da die Tierzahl in der vorgeschlagenen Berechnung unter der Wurzel eingeht, ist es in unserem Falle völlig ausreichend, eine relativ grobe Korrektur anzubringen. Es genügt völlig, die wahren Tierzahlen mit einem Faktor zu multiplizieren, wie in Tab. 1 angegeben. Hiervon haben wir uns durch entsprechende Versuche hinreichend überzeugt. Diese so gewonnene Tierzahl gilt auch für eine gegebenenfalls spätere Signifikanzberechnung.

Tabelle 1

Wirkungs-Prozent	Faktor
0 — 10	0,5
10,1— 29,9	0,75
30 — 70	1,0
70,1— 89,9	0,75
90 —100	0,5

Bei der Berechnung der Flächen mußte noch geprüft werden, ob bei der relativ groben Gruppeneinteilung die Sheppardsche Korrektur berücksichtigt werden muß. Der hierdurch bedingte Fehler hebt sich bei der Bestimmung des Mittelwertes auf. Bei der vorgeschlagenen Berechnung der Streuung ist dies nicht der Fall. Eine Prüfung der Frage hat ergeben, daß bei den gegebenen Voraussetzungen der durch Vernachlässigung der Korrektur bedingte Fehler unter 1% liegt. Da die Zahl der Tiergruppen zwischen 0 und 100% die Zahl 8 im allgemeinen nicht überschreitet, mindestens aber 4 betragen sollte, ist es durchaus gerechtfertigt, einen Durchschnittswert einzusetzen. Würde man den Versuch in eine Vielzahl von Gruppen — 20 und mehr — unterteilen, so würde man dann allerdings etwas zu ungünstige Werte erhalten.

Die erwähnten Werte, Flächenfaktor und Umrechnungsfaktor (Zentralwert/Arithmetisches Mittel) lassen sich zu einem Zahlenwert vereinigen. Die gesuchte Größe ist rund 62.

Die gesuchte Streuung der LD_{50} $\varepsilon = \frac{F_1 + F_2}{62{,}25 \cdot \sqrt{\text{Tierzahl}}}$.

In einer größeren Anzahl von Versuchen haben wir uns von der Richtigkeit dieses Faktors überzeugt. Mit berechneten Kollektiven, deren Einzelwerte auf Zettel geschrieben wurden, haben wir in Art eines Lotteriespieles größere Reihen von Versuchen durchgeführt und uns davon überzeugt, daß die errechnete Streuung mit der tatsächlich ermittelten Streuung gut übereinstimmt.

Weiter haben wir Vergleichsversuche mit Auswertung nach diesem Verfahren und dem Probit-Verfahren durchgeführt. Einige Vergleichsberechnungen mit in der Literatur aufgeführten Musterbeispielen gibt die folgende Tabelle.

Tabelle 2

LD_{50} bzw. ED_{50} (Literatur)	LD_{50} bzw. ED_{50} (nach KÄRBER)	Vertrauensgrenzen (Literatur)	Vertrauensgrenzen	
0,0251	0,0251	0,0241 — 0,0261	0,0246 — 0,0256	BURN (1950) S. 114 bis 120
0,175	0,177	0,10 — 0,30	0,105 — 0,298	LITCHFIELD u. WILCOXON
4,85	4,85	4,38 — 5,36	4,44 — 5,33	FINNEY, S. 26—42
4,92	4,78	4,26 — 5,69	4,25 — 5,38	WEBER, S. 387—89
0,07	0,068	0,05 — 0,1	0,051 — 0,092	KRAUSHAAR, S. 248

Aus diesen vorstehenden Zahlen kann man ersehen, daß die Ergebnisse der Berechnung recht gut miteinander übereinstimmen. Es ist selbstverständlich, soll aber nochmals ausdrücklich betont werden, daß eine solche Übereinstimmung nur dann zu erwarten ist, wenn gewisse Voraussetzungen für die Anwendung der Methode eingehalten werden, die sich aus dem oben Gesagten ergeben. Es muß mit den einzelnen Tiergruppen die Ausdehnung des gesamten Kollektivs weitgehend erfaßt sein, die Zahl der einzelnen Tiergruppen zwischen der Dosis mit 0 und 100% muß eine ausreichende sein (mindestens 4—5). Die Versuchsgruppen müssen sich einigermaßen gleichmäßig über das gesamte Kollektiv verteilen. Die vorgeschlagene Methode kann daher mit besonderem Vorteil bei Prüfungen angewandt werden, bei denen experimentell diese Voraussetzungen leicht zu schaffen sind. Dies ist der Fall bei der Prüfung der Toxicität neuer Substanzen.

Für praktische Zwecke erscheint das Verfahren mit den beschriebenen Abrundungen absolut ausreichend. Eine weitere Verfeinerung wäre leicht möglich, wenn an Stelle der oben erwähnten Abrundungen (SHEPPARDsche Korrektur und Bewertungskoeffizienten) exakte Werte eingesetzt

werden. Die Berechnung nach Kärber, das Probit-Verfahren und ebenso die eben geschilderte Berechnung der Streuung, haben, wie schon gesagt, den gemeinsamen Nachteil, daß eine Normalverteilung Grundlage der Berechnung ist. Ist dies nur annähernd der Fall, so ergibt sich ein entsprechender Fehler. Bei der Unsicherheit dieser Frage darf man daher streng genommen nur gleichartige und gleichartig berechnete Versuche miteinander vergleichen. Eine übertrieben genaue Berechnung führt schon aus diesem Grund nicht zu einer Verbesserung der Ergebnisse, die zu der aufgewandten Mühe in einem angemessenen Verhältnis steht.

In früheren Jahren ist man bei derartigen Berechnungen von der Annahme ausgegangen, daß es sich bei der Streuung von Giftempfindlichkeiten um eine normale oder doch annähernd normale Verteilung handele. Es mehren sich die Stimmen, die eine lognormale Verteilung für richtiger halten. Behandelt man denselben Versuch einmal unter der Annahme einer Normalverteilung (die Dosenwerte werden direkt in die Berechnung eingesetzt) und das andere Mal unter der Annahme einer lognormalen Verteilung (an Stelle mit den Dosen wird mit dem Logarithmen der Dosen die Rechnung durchgeführt), so ergeben sich, wie zu erwarten, *Unterschiede*. Doch sind diese meistens nicht so groß, *daß sie wesentlich ins Gewicht* fallen, es sei denn, daß die Streuung des Tiermaterials eine ganz ungewöhnlich hohe ist. Will man zwei Substanzen miteinander vergleichen, so ist es natürlich selbstverständlich, entweder die eine oder die andere Annahme zu machen. In *jedem* Fall dürfte das Versuchsergebnis mit einem konstanten Fehler behaftet sein. Es ist unwahrscheinlich, daß eine streng normale Verteilung vorliegt, ebenso unwahrscheinlich ist eine streng lognormale Verteilung. Selbst wenn man annimmt, daß die Tierempfindlichkeit einer lognormalen Verteilung folgt, so ist dies nicht der Fall bei dem Spritzenablesefehler, der ja auch in das Ergebnis eingeht. Die Frage ist nur die, bei welcher Annahme der kleinere Fehler gemacht wird. Die Wirkung eines Stoffes ist die Resultante vieler vielgestaltiger Prozesse, die alle verschiedenen Gesetzen unterworfen sind, deren Streuung auch wohl kaum auf einen gemeinsamen Nenner gebracht werden kann. Diese Überlegungen führen zu dem Ergebnis, daß eine allgemein gültige Gesetzmäßigkeit kaum zu erwarten ist (s. auch Kiese 1950). Eigentlich ist es überraschend, und es war von vornherein nicht vorherzusehen, daß bei der Bestimmung der tödlichen Dosis und auch bei anderen biologischen Wirkungen eine überhaupt annähernd normale Streuung der Versuchswerte gefunden wird. Es ist schwer zu entscheiden, ob die Annahme einer lognormalen Verteilung den tatsächlichen Verhältnissen besser gerecht wird. Um diese Frage zu klären, wären Massenexperimente nötig, die sich technisch kaum durchführen lassen. Die als Beweis oft angesehenen Versuche mit

Besprayen von Insekten sind schwer zu beurteilen, weil die Giftmenge, die das einzelne Tier tatsächlich erhält, ja eine neue Variable darstellt. Es erscheint uns daher fraglich, ob die Annahme einer lognormalen Verteilung (z. B. bei Toxicitätsbestimmungen) eine Verbesserung der Ergebnisse bei der Berechnung des Mittelwertes und seiner Streuung darstellt.

Auch bei dem von uns vorgeschlagenen Verfahren ist ein Vorversuch zur ungefähren Festlegung der DL_{50} erforderlich. Auf die Frage, wie diese zweckmäßig anzustellen sind und auch auf die oft behandelte Frage über Auswahl der Tiere für die einzelnen Gruppen, um eine ungewollte Selektion zu vermeiden, soll hier nur hingewiesen werden.

Anschließend sollen noch einige Rechenbeispiele gebracht werden.

Rechen-Beispiele

Tabelle 3a. *Beispiel I: Berechnung des Mittelwertes mit der Formel von* KÄRBER *bei der Annahme lognormaler Verteilung [Zahlenwerte siehe* BURN *(1950), S. 114, tödl. Dosen von Cocainhydrochlorid für Mäuse]*

1 Dosis in mg	2 log Dos. × 100[1]	3 Gruppenabstand	4 Tierzahl in der Gruppe	5 Mort.-%	6 Mittl. Mortalitäts-%[2]	7 Spalte 3 × 6
0,015	0,176		20	0		
		0,125			8	1,000
0,020	0,301		69	16		
		0,097			34,5	3,347
0,025	0,398		95	53		
		0,079			65,5	5,175
0,030	0,477		78	78		
		0,067			81	5,427
0,035	0,544		44	84		
		0,058			92	5,336
0,040	0,602		20	100		
						$\Sigma = 20{,}285$[3]

log Dos. Mort. 100% $= \frac{\Sigma \text{ Spalte } 7}{100}$ ist der gesuchte Mittelwert (log · 100) also

$$0{,}602 - 0{,}2029 = 0{,}3991 \qquad M = 0{,}0251$$

[1] Vor dem Logarithmieren sind die Dosen evtl. mit 10, 100 oder 1000 usw. zu multiplizieren, damit der Logarithmus der niedrigsten Dosis keinen negativen Wert ergibt. Das später erhaltene Resultat muß dann entsprechend durch 10, 100 oder 1000 dividiert werden. Ist die niedrigste Dosis = 0, so genügt es, alle Werte mit 10000 zu multiplizieren; als log 0 · 10000 wird dann 1,000 gesetzt.

[2] Entspricht der Summe der Mortalitätsprozent zweier benachbarter Gruppen dividiert durch 2.

[3] Entspricht der schraffierten Fläche in Abb. 1 B. Diese Fläche ist gleich der Dreiecksfläche *a*—*d*—*c*. Σ Spalte 7 dividiert durch 100 entspricht der Strecke *b*—*c* in Abb. 1 B.

Tabelle 3b. *Berechnung der Streuung*

In der Spalte 2 und 5 der Tabelle 3a wird der gefundene Mittelwert eingetragen.

1 log Dos. × 100	2 Gruppen-abstand	3 Mort.-%	4 Mittlere Mort.-%	5 Mittl. Überlebens-%	6 Spalte 2 × Spalte 4[1] bzw. × Spalte 5
0,176		0			
	0.125		8		1,000
0,301		16			
	0,097		34,5		3,347
0,398		53			
	0,001		51,5		0,052
0,399		50			
	0,078			36	2,808
0,477		78			
	0,067			19	1,273
0,544		84			
	0,058			8	0,464
0,602		100			
					= 8,944

$$\log \varepsilon \cdot 100 = \frac{\Sigma \text{ Spalte } 6}{62{,}25 \sqrt{n}}$$

Tierzahl n (Spalte 4 der vorherigen Tabelle) zwischen 0 und 100% Mort. (siehe S. 64).

also: $\frac{8{,}944}{62{,}25 \sqrt{258}} = 0{,}00884$

$69 \cdot 0{,}75 = 51{,}8$
$95 \cdot 1{,}0 = 95$
$78 \cdot 1{,}0 = 78$
$44 \cdot 0{,}75 = 33$

$n = 257{,}8$

Ergebnis: $\log M \cdot 100 = 0{,}3991 \pm 0{,}0088$

Die Vertrauensgrenzen sind dann:

0,3991	0,3991
$-2\,\varepsilon$ 0,0176	$+2\,\varepsilon$ 0,0176
0,3815	0,4167

Das Endergebnis lautet dann $M = 0{,}0251$ (0,0241 — 0,0261).

Bei Vergleichsversuchen von 2 Substanzen werden die Signifikanzberechnungen in der üblichen Weise durchgeführt, am zweckmäßigsten mit Verwendung der t-Tabelle von Student. Die hierfür erforderliche Tierzahl ist die reduzierte Tierzahl (s. Tab. 1).

[1] Die Summe (Spalte 4 · Spalte 2) bis zum Mittelwert ist gleich Fläche F_1, Summe (Spalte 5 · Spalte 2) vom Mittelwert bis zur Gruppe mit der Mortalität 100% ist entsprechend F_2 (Abb. A).

Tabelle 4. *Beispiel II: Bestimmung des Mittelwertes aus den Flächen F_1 und F_2* (Behrens 1929) *bei der Annahme lognormaler Verteilung. Es sind dieselben Versuche zugrunde gelegt wie im Beispiel I*

1 Dosis mg	2 log Dos. × 100	3 Gruppenabstand	4 Tierzahl in der Gruppe	5 Mort.-%	6 Mittlere Mort.-%	7 Spalte 3 × Spalte 6	8 Spalte 3 × 100 — Spalte 7	
0,015	0,176		20	0				
		0,125			8	1,000	11,5	
0,020	0,301		69	16				
		0,097			34,5	3,347	6,353	
0,025	0,398		95	53				$\frac{4,347}{8,809} = 0,493$
		0,079			65,5	5,175	2,725	
0,030	0,477		78	78				$\frac{9,522}{11,259} = 0,846$
		0,067			81	5,427	1,273	
0,035	0,544		44	84				
		0,058			92	5,336	0,464	
0,040	0,602		20	100				

Man addiert die Teilflächen (Spalte 7) bis zum vermuteten Mittelwert und nimmt die Zahl als Zähler. Der Nenner ist diese Zahl plus der Teilflächen (Spalte 8) der höheren Dosen. Die Zahlen werden dividiert. Ist das Resultat kleiner als 0,5, so wird das Verfahren bis zur nächsten Gruppe wiederholt. Es werden die benachbarten Gruppen gesucht, deren Zahlenwert einmal unter, das andere Mal über 0,5 liegt. Zwischen diesen beiden Gruppen liegt der gesuchte Mittelwert. Er wird durch Interpolation ermittelt. Hierzu ist man berechtigt, da unabhängig von der Verteilung die Mortalitätskurve um den Mittelwert immer eine Gerade darstellt.

$$\frac{\text{Der Abstand der beiden Gruppen} \cdot (0{,}5 - \text{der kleinen Zahl})}{\text{große Zahl} - \text{kleine Zahl}} \cdot a$$

also

$$\frac{0{,}079\,(0{,}5-0{,}493)}{0{,}846-0{,}493} = 0{,}0016\ (a).$$

Dieser Wert zu dem Wert der niedrigeren Dosis addiert, ergibt die gesuchte mittlere Dosis. In unserem Beispiel also

$$\log M \cdot 100 = 0{,}398 + 0{,}0016 = 0{,}3996.$$

Zur Berechnung der Streuung muß zu der bereits bestimmten Fläche (bis zu der dem Mittelwert benachbarten niederen Dosis) noch der Flächenwert zwischen dieser Dosis und dem Mittelwert addiert werden. Man bildet zwischen der Mortalität dieser Dosis und der Mortalität 50% den Mittelwert und multipliziert mit dem Abstandwert (a).

Also

$$\frac{53+50}{2} \cdot 0{,}0016 = 0{,}0824.$$

Die Fläche F_1 ist also $1{,}000 + 3{,}347 + 0{,}0824 = 4{,}4294$.

Da bei dieser Berechnung die Flächen F_1 und F_2 gleich sind, berechnet sich die Streuung:

$$\varepsilon = \frac{4{,}429}{31{,}1\sqrt{258}} = 0{,}0086 \quad \text{(Ermittlung der Tierzahl s. Beispiel I)}$$

$$\log M \cdot 100 = 0{,}3996 \pm 0{,}0086$$

$$M = 0{,}0251 \ (0{,}0241 - 0{,}0261).$$

Wird der Versuch so angelegt, daß gleiche Gruppenabstände und gleiche Tierzahl in der Gruppe in den Versuch genommen werden, so vereinfachen sich die beiden vorstehenden Verfahren wesentlich. Im folgenden soll ein derartiges Beispiel gezeigt werden.

Tabelle 5. *Beispiel III: Vereinfachte Berechnung bei Versuchen mit gleichem Dosenabstand und gleicher Tierzahl in den Gruppen (nach* Behrens 1929). *Annahme einer Normalverteilung*

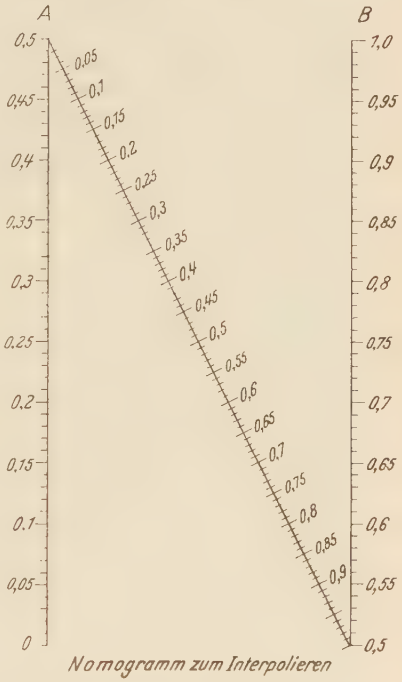
1 Dosis	2 Verhältnis tot/überlebend	3	
(0,4)[1]	0/6		
		0,5/5,5	
0,8	1/5		
		2,0/4,0	$\frac{2{,}5}{2{,}5+6{,}5} = 0{,}278$ (A)
1,2	3/3		
		2,5/3,5	$\frac{5{,}0}{5{,}0+3{,}0} = 0{,}625$ (B)
1,6	2/4		
		3,5/2,5	
2,0	5/1		
		5,5/0,5	
(2,4)[1]	6/0		

[1] Die Dosen wurden nicht geprüft, sondern zur Berechnung ergänzt. Berechtigung hierzu siehe Behrens u. Kärber.

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, nicht wie bei Behrens (1929) angegeben von den Klassengrenzen sondern von den Klassenmitten auszugehen. Im anderen Falle müßte bei der anschließenden Streuungsberechnung wie bei der Kärberschen Methode auch die zweite Fläche berechnet werden. Die Zahlen zwischen den Gruppen (Spalte 3) bedeuten die gemittelten Mortalitäten bzw. Überlebenden. Es werden die Toten bei der niedrigsten Dosis beginnend zusammengezählt und bei den Gruppen, die in der Nähe des gesuchten Mittelwertes zu liegen scheinen,

als Zähler eines Bruches aufgeschrieben. Der Nenner dieses Bruches ist diese Zahl plus der Zahl der Überlebenden aller Gruppen mit höheren Dosen.

Wenn der erste Bruch kleiner als 0,5, der zweite aber größer als 0,5 ist, muß der gesuchte Mittelwert zwischen den beiden Gruppen liegen. Er wird durch Interpolieren bestimmt (s. Beispiel II). Dieses Interpolieren läßt sich wesentlich dadurch erleichtern, daß man den Wert für $\frac{0{,}5 - A}{B - A}$ aus einem einfach herzustellenden Nomogramm abliest. Der erhaltene Wert (mittlere Säule des Nomogramms) ist nur noch mit dem Dosenabstand zu multiplizieren. Das Resultat zu dem Grenzwert der niederen Dosis addiert, gibt den gesuchten Mittelwert.



Nomogramm zum Interpolieren

Abb. 2

Also:

$$0{,}64 \cdot 0{,}4 = 0{,}265.$$

M ist dann

$$1{,}2 + 0{,}26 = 1{,}46.$$

Die Berechnung der Streuung erfolgt wie in Beispiel II. Der gefundene Mittelwert wird eingesetzt und die Fläche F_1 berechnet.

$$(0{,}5 + 2{,}0) \cdot 0{,}4 = 1{,}0$$
$$3{,}0 \cdot 0{,}26 = 0{,}78$$
$$1{,}78$$

Da nun noch auf Prozent-Mortalität umgerechnet werden muß, ergibt sich

$$\varepsilon = \frac{\text{Fläche}}{31{,}1 \cdot \sqrt{\text{Tierzahl}}} \cdot \frac{100}{\text{Tierzahl in der Gruppe}}$$

Die Tierzahl wird wie oben beschrieben ermittelt: $6 \cdot 0{,}75 = 4{,}5$

$6 \cdot 1{,}0 = 6{,}0$

$6 \cdot 1{,}0 = 6{,}0$

$6 \cdot 0{,}75 = 4{,}5$

$21{,}0$

$$\varepsilon = \frac{178}{31{,}1 \cdot 6 \cdot \sqrt{21}} = 0{,}21.$$

M ist also $1{,}46 \pm 0{,}21$.

Zusammenfassung

1. Die von W. Wilbrandt an dem von B. Behrens (1929) angegebenen Verfahren zur Ermittlung der mittleren tödlichen Dosis geübte Kritik wird als unbegründet zurückgewiesen.

2. Es wird ein einfaches Verfahren angegeben, bei der Berechnung der mittleren tödlichen Dosis nach der Methode von Behrens oder bei Berechnung mit der Kärberschen Formel die Streuung der Versuchsergebnisse zu berechnen und damit die Möglichkeit gegeben, bei Anwendung dieser Methoden Signifikanzberechnungen durchzuführen.

3. Die vorgeschlagene Berechnung hat den Vorteil, daß keine Hilfstabellen oder Wahrscheinlichkeitspapier erforderlich sind.

4. Zur Frage, ob bei derartigen Berechnungen die Annahme einer normalen oder lognormalen Verteilung zweckmäßigerweise zugrunde zu legen ist, wird diskutiert.

Literatur

Behrens, B.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **140**, 237 (1929). — Behrens, B., O. Gros und F. Hildebrandt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **167**, 365 (1932). — Behrens, B., u. G. Kärber: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **177**, 379 (1935). — Burn, J. H.: Biologische Auswertungsmethoden, Deutsche Übersetzung von E. Bülbring. Berlin: Springer 1937. - Biological Standardization, 2. Aufl. London: Oxford University Press 1950. — Finney, D. J.: Probit Analysis, 2. Aufl. Cambridge 1952. — Gaddum, J. H.: Reports on Biological Standards, Spec. Rep. Ser. Med. Res. Coun. Lond. 183 (1933). — Pharmacol. Rev. **5**, 87 (1953). — Kärber, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **162**, 480 (1931). — Kiese, M.: Klin. Wschr. **1950**, 385. - Kraushaar, A.: Arzneimittelforsch. **3**, 247 (1953). - Litchfield, J. T. jr., and F. W. Wilcoxon: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 99 (1949). — Mehsel, P.: Dissertation Kiel 1955. — Waerden, B. L. van der: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **195**, 389 (1940). - Weber, E.: Grundriß der biologischen Statistik, 2. Aufl. Jena 1956. – Wilbrandt, W.: Arzneimittelforsch. **2**, 501 (1952).

Prof. Dr. med. B. Behrens, Pharmakol. Institut der Univ. Kiel, Hospitalstr. 20

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 73—79 (1957)

Aus den Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

Erreichung eines konstanten Wirkungsniveaus durch aufeinanderfolgende Dosen von Testosteronestern

Von
R. Meier und P. Desaulles

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. Oktober 1956)

Die therapeutische Anwendung von Steroidhormonen erfordert einerseits die Anwendung einzelner Dosen mit bestimmter Wirkungsdauer und andererseits die Durchführung von Behandlungen, bei denen ein konstantes Niveau der Wirkung über einen längeren Zeitraum erhalten werden muß. Die Dosierungsart für derartig verschiedene Therapieformen muß ungleichartig sein.

Wir haben in früheren Arbeiten [Meier u. Tschopp (1—3)] die Verhältnisse, die sich für die Erreichung einer optimalen Wirkung mittels einmaliger Dosen ergeben, im einzelnen dargelegt. Bei der Beurteilung der Wirkung sind verschiedene Faktoren zu berücksichtigen, besonders die Abhängigkeit des Wirkungsanstieges, des Wirkungsmaximums, des Wirkungsabfalles und der Fläche der Zeitwirkungskurve von Dosis und Wirkungstypus der Verbindung. Wir haben auf Grund dieser Befunde ferner gezeigt, wie mit Hilfe der Kombination verschiedenartiger Verbindungen mit ungleichen Formen der Zeitwirkungsfläche optimale Voraussetzungen erzielt werden können, um mit einer Dosis mehrere Anforderungen zu erfüllen, z. B. einen raschen Wirkungsanstieg und eine lange Dauer.

Aus den gleichen Untersuchungen ergab sich aber, daß sich mit den vorhandenen Verbindungen nur ein bestimmtes Optimum der Wirkungsdauer bei Einhaltung anderer Bedingungen erreichen läßt.

Damit bleibt die Beantwortung der Frage wichtig, wie mit Hilfe von aufeinanderfolgenden wiederholten Dosen eine konstante Wirkung erzielt werden kann. In diesem Falle handelt es sich grundsätzlich um die Bestimmung der Erhaltungsdosis für ein durch eine vorhergehende Dosis erreichtes Niveau. Verschiedene Möglichkeiten zur praktischen Lösung sind in Betracht zu ziehen. Einerseits kann der Versuch gemacht werden, nach Erreichung des Maximums die Wirkung mit Dosen aufrecht

zu erhalten, welche gerade die Erhaltungsdosis darstellen. Bei einem solchen Vorgehen kann vermutet werden, daß bei den anzuwendenden Dosen eine unzweckmäßige Verkürzung der Wirkungsdauer in Kauf genommen werden muß.

Als zweite Möglichkeit kann eine zweite Dosis erst bei einem gewissen Abfall der Wirkung angeschlossen werden. Dabei muß eine wellenförmige Schwankung der Wirkungshöhe eintreten, die ebenfalls nicht ganz optimal ist. Es ergibt sich deshalb, daß unter diesen verschiedenen Möglichkeiten solche auszuwählen sind, die das therapeutische Optimum darstellen.

An Hand der vorliegenden Befunde, besonders durch Kombination von Wirkungsflächen lassen sich bereits grundsätzliche Vorstellungen über diese Verhältnisse entwickeln, doch bleibt die experimentelle Entscheidung notwendig, welche Gesetzmäßigkeiten im Einzelfalle tatsächlich vorliegen. Wir haben deshalb einen auf den dargelegten Überlegungen basierenden Versuchsplan aufgestellt, um die diskutierte Frage zu prüfen.

Wir möchten aber zunächst noch auf etwas anderes hinweisen. Wir sind auf Grund unserer zahlreichen Erfahrungen und Untersuchungen auf diesem Gebiete zu der Auffassung gekommen, daß die von uns untersuchten Probleme nicht nur für die Steroide oder analoge Stoffe Bedeutung haben, sondern daß sämtliche pharmakologischen Wirkungen, von welchem Typus sie auch sein mögen, ähnlichen Gesetzmäßigkeiten unterworfen sind. Es ist durchaus denkbar, daß z. B. die bisher nicht völlig einwandfrei realisierte Möglichkeit einer konstanten Dauerwirkung mit Depotinsulin, mit Proteohormonen deshalb nicht erreicht werden konnte, weil die in diesen Arbeiten mit Steroidhormonen behandelten Voraussetzungen nicht in idealer Weise erfüllt sind. Auch für die heute immer mehr Bedeutung gewinnenden „retard"-Formen müssen analoge Gesichtspunkte beachtet werden, sollen besondere Wirkungen, z. B. schneller Wirkungseintritt und lange Dauer erzielt werden. Die in unseren Untersuchungen herausgearbeiteten Gesetzmäßigkeiten sind mit großer Wahrscheinlichkeit für weite Gebiete der Therapie wichtig.

Methode

Wie in früheren Arbeiten, haben wir als Versuchsobjekt den Kapaunenkamm verwendet. Das Kammwachstum wurde durch planimetrische Ausmessung des Areals bestimmt. Als Wirkungsgröße haben wir eine Zunahme des Kammes bei 350% festgelegt. Diese stellt ungefähr 60% der maximal erreichbaren Kammgröße dar. Diesen Punkt der Kurve haben wir aus dem Grunde gewählt, weil wir annehmen, daß er noch genügend im nicht logarithmischen Teil der Wachstumskurve liegt. Die Hormone wurden intramuskulär einmalig oder in bestimmten Intervallen injiziert.

Versuchsplan

Entsprechend der Absicht dieser Versuche, sollte ermittelt werden, in welcher Weise am einfachsten durch aufeinanderfolgende Dosen eines Hormonesters eine konstante kontinuierliche Wirkung erzielt werden kann. Die Voraussetzung für die Behandlung dieser Frage beruht im wesentlichen auf der Feststellung der Dosis, die für die Erhaltung einer durch eine primäre Dosis erreichten Kammgröße notwendig ist bei der gleichen Verbindung. Ist diese bekannt, so kann diejenige Applikationsform eines Esters ausgewählt werden, die am besten den Verhältnissen angepaßt ist.

Ohne Bestimmung der Konzentration der Wirkstoffe im Organismus, ist diese Frage dadurch zu klären, daß bei einer durch eine primäre Dosis erreichten Wirkung die gleiche Dosis und Teile derselben an die erste angeschlossen werden. Auf Grund der erreichten oder fehlenden zusätzlichen Wirkung kann dann beurteilt werden, wie hoch die Erhaltungsdosis ist im Verhältnis zur primären Dosis und dadurch ein allgemeines Urteil abgeleitet werden.

Neben der Kenntnis dieses Faktors ist aber noch die Akblärung einer zweiten Frage von Bedeutung. Es ist wohl anzunehmen, daß die Fortsetzung einer Wirkung auf dem Maximum eine andere Dosis erfordert, als wenn die Wirkung bereits von der erreichten Höhe wieder um einen bestimmten Prozentsatz abgesunken ist. Es ist sogar möglich, daß auch nach Absinken auf den Nullpunkt für eine angeschlossene zweite Dosis etwas andere Wirkungsverhältnisse vorliegen wie bei der primären Dosis. Daraus folgt, daß es wünschenswert ist, die Sachlage zu kennen, welche Wirkungen durch gleiche oder Teildosen einer primären Dosis erzielt werden, wenn die nachfolgenden Dosen einerseits auf der Höhe der Wirkung, andererseits auf verschiedenen Punkten des absteigenden Schenkels der Wirkung gegeben werden. Da diese Varianten ein erhebliches Arbeitsvolumen darstellen, haben wir möglichst charakteristische Dosenkombinationen ausgewählt und untersucht.

Versuchsresultate

Für die Versuche wurde die Kombination solcher Dosen benützt, die ein eindeutiges Resultat erwarten ließen. Da zu vermuten war, daß die Gabe der gleichen Dosis auf dem Maximum der erreichten Wirkung eine starke zusätzliche Erhöhung derselben ergeben würde und so auch auf dem abfallenden Teil der Wirkung, wurde vor allem die halbe Primärdosis oder geringere Bruchteile der gleichen Verbindung für die verschiedenen Versuchsvarianten verwandt. Die untersuchte Verbindung ist Testosteron-isobutyrat in öliger Lösung.

Injektion verschiedener Dosen auf der Höhe der erreichten Wirkung

Als primäre Dosis wurde eine Injektion von 10 mg Testosteron-isobutyrat gegeben. Mit dieser wird ein hohes Wirkungsniveau erreicht, das etwa 60% des maximalen Kammwachstums darstellt.

Die erste Versuchsvariante betrifft Versuche, bei denen nach dem erreichten Maximum verschiedene Dosen injiziert werden, 2,5 und 10 mg des gleichen Präparates (Abb. 1). Bei der Injektion von 10 mg kommt es zu einem weiteren erheblichen Anstieg der Wirkung, der annähernd gleich dem durch die primäre Dosis erreichten ist. Das Gesamtmaximum bleibt hinter der Summe etwas zurück. Das kann zwei

Gründe haben. Entweder braucht der Kamm für den höheren Anstieg eine relativ höhere Schwellendosis oder aber der obere Teil der Kurve fällt bereits nicht mehr in den linearen Wirkungsanstieg. Im Prinzip wird aber durch den Effekt die Situation charakterisiert.

Bei Verkleinerung der Dosis tritt auch noch bei der Gabe von 2,5 mg, auf der Höhe der Wirkung injiziert, eine Zunahme des Wachstums ein.

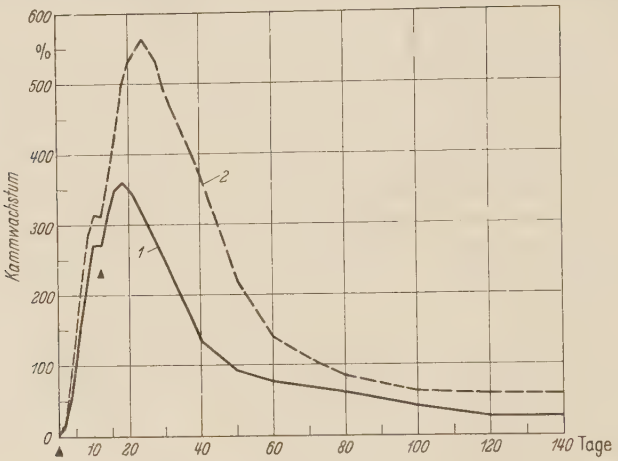


Abb. 1. Wirkung verschiedener Dosen von Testosteron-isobutyrat, appliziert auf der Höhe des durch eine primäre Dosis der gleichen Verbindung erreichten Effektes. 1: 1 × 10 mg Testosteron-isobutyrat + 1 × 2,5 mg Testosteron-isobutyrat am 12. Tag. 2: 1 × 10 mg Testosteron-isobutyrat + 1 × 10 mg Testosteron-isobutyrat am 12. Tag.

Diese entspricht nicht voll dem durch 2,5 mg als primäre Dosis erreichbaren Effekt, sie ist aber doch noch sehr ausgesprochen. Diese Befunde zeigen somit eindeutig, daß diejenige Dosis, die auf der erreichten Wirkungshöhe notwendig ist, um die Wirkung auf diesem Niveau zu erhalten, hinsichtlich ihrer täglichen Resorptionsgröße kleiner sein muß als die Dosis von 2,5 mg. Aus dieser Feststellung ergibt sich, daß zur Erhaltung der Höhe der Wirkung eine relativ viel kleinere Resorptionsgröße notwendig ist als für den primären Wirkungsanstieg. Diese Notwendigkeit führt zwangsläufig dazu, daß mit einer so kleinen Dosis der gleichen Verbindung die durch sie zu erreichende Wirkungsdauer kurz wird.

Injektion von verschiedenen Dosen auf der Mitte des Wirkungsabfalles

Die zweite, für die Beurteilung der eingangs gestellten Frage notwendige Versuchsvariante ist, festzustellen, mit welcher Dosis eine Wirkung vom absteigenden Schenkel auf das vorher erreichte Niveau zu erheben ist (Abb. 2). Zu diesem Zweck werden in dem Zeitpunkt, wo der Wirkungsabfall etwa 50% beträgt, die gleichen sekundären Dosen

gegeben wie bei der ersten Versuchsserie. Es ergibt sich, daß die Dosis von 5 mg, in diesem Zeitpunkt appliziert, noch einen Wirkungsanstieg ergibt, der erheblich höher ist als das vorher erreichte Niveau. Diese Dosis ist somit bereits zu groß, um ein konstantes Niveau auf der durch die Primärdosis erreichten Höhe zu gewährleisten. Injiziert man zu dem gleichen Zeitpunkt 2,5 mg, so wird gerade die Höhe der Primärwirkung erreicht. Es muß somit auch in diesem Falle eine relativ kleine Dosis

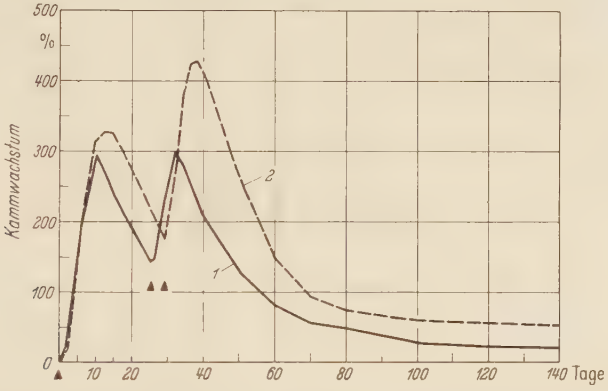


Abb. 2. Wirkung verschiedener Dosen von Testosteron-isobutyrat, appliziert in der Mitte des Abfalls von einem durch eine primäre Dosis der gleichen Verbindung erzielten Maximum. 1: 1 × 10 mg Testosteron-isobutyrat + 1 × 2,5 mg Testosteron-isobutyrat am 25. Tag. 2: 1 × 10 mg Testosteron-isobutyrat + 1 × 5 mg Testosteron-isobutyrat am 29. Tag

gewählt werden, um nicht einen überschießenden Effekt zu erzielen. Mit der Wahl der kleineren Dosis ergibt sich wiederum die Folge, daß die damit erreichte Wirkungsdauer kürzer ist, als wenn 5 oder 10 mg in diesem Zeitpunkt appliziert werden.

Es kann auf Grund dieser Befunde die Dosis, bzw. die tägliche Resorptionsgröße eingegrenzt werden, welche entweder auf der Höhe, bzw. auf dem Abfall der Wirkung für die Erhaltung einer gleichmäßigen Wirkungshöhe optimale Bedingungen bietet.

Anwendung eines zweiten Esters auf der Höhe der Wirkung

Aus den vorstehenden Befunden geht eindeutig hervor, daß die Dosis für die Erhaltung der Wirkung auf ihrem Maximum unter der Resorptionsgröße der Dosis von 2,5 mg Testosteron-isobutyrat liegen muß. Es sind also für die konstante Fortsetzung der Wirkung Dosen unter einem Viertel der Primärdosis zu wählen, um diesem zu entsprechen. Die in diesem Fall stark verkleinerte Dosis bietet sowohl in experimenteller Hinsicht Schwierigkeiten, wie sie auch für die praktische Anwendung durchaus unzweckmäßig ist. Es ist deshalb vorzuziehen, für die

Fortsetzung der Wirkung in dieser Situation einen Ester mit wesentlich längerer Wirkungsdauer zu wählen.

Um die Versuchszahl möglichst zu beschränken, wurde die Auswahl des Esters und seiner Dosierung auf Grund folgender Überlegung getroffen: Gestützt auf die bisherigen Befunde ist anzunehmen, daß auch für die Geschwindigkeit des Wirkungsanstieges eine bestimmte Resorptionsgröße notwendig ist. Ist dieses richtig, so sollte eine annähernd gleiche Resorptionsgröße bei Verbindungen vorliegen, welche eine gleiche Neigung des Wirkungsanstieges zeigen. Vergleicht man den Wirkungsanstieg

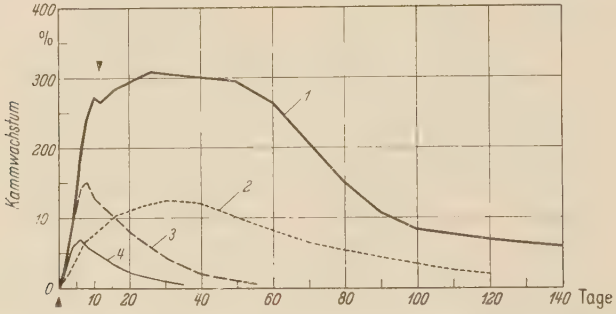


Abb. 3. Wirkung einer Erhaltungsdosis von Testosteron-undecylenat, appliziert auf der Höhe des durch eine primäre Dosis von Testosteron-isobutyrat erreichten Effektes. 1: 1 × 10 mg Testosteron-isobutyrat + 1 × 2,5 mg Testosteron-undecylenat am 12. Tag. 2: 1 × 2,5 mg Testosteron-undecylenat. 3: 1 × 2,5 mg Testosteron-isobutyrat. 4: 1 × 1 mg Testosteron-isobutyrat

der Dosen von 1 mg, bzw. 2,5 mg Testosteron-isobutyrat mit den entsprechenden Dosen von dem länger wirkenden Ester Testosteron-undecylenat, so ist der Wirkungsanstieg bei der Dosis von 2,5 mg Testosteron-undecylenat deutlich flacher als der von 2,5 mg Testosteron-isobutyrat und entspricht etwa demjenigen von 1 mg Testosteron-isobutyrat. Es scheint somit, daß die Dosis von 2,5 mg Testosteron-undecylenat die gewünschte Resorptionsgröße für die Wirkungserhaltung besitzt. Es sollte diese Dosis, auf der Höhe der Wirkung nach einer Primärdosis von 10 mg Testosteron-isobutyrat injiziert, eine konstante Wirkung von längerer Dauer ergeben.

Wie die anliegende Abbildung zeigt, ist dieses in der Tat der Fall (Abb. 3). Es kommt zwar noch zu einer ganz geringen Zunahme des Effektes, aber es ist in jeder Hinsicht überzeugend, daß die Dosis von 2,5 mg Testosteron-undecylenat eine fast kontinuierliche Fortsetzung der Wirkung von 10 mg Testosteronisobutyrat auf der erreichten Höhe erlaubt.

Mit diesen Befunden ist die eingangs gestellte Frage beantwortet.

Für den praktischen Fall wird man nun die Erzielung einer konstanten Dauerwirkung nicht dadurch zu erreichen suchen, daß nach primärer

Gabe eines relativ kurzwirkenden Esters eine Dosis eines langwirkenden gegeben wird. Das zweckmäßigere Verfahren ist, daß eine Mischung eines langwirkenden Esters mit kurzwirkenden Estern gewählt wird, um sowohl einen schnellen Wirkungsanstieg sowie vom Beginn an eine lange Wirkungsdauer zu erzielen. In welcher Weise eine solche optimale Kombination erhalten werden kann, haben wir in einer früheren Arbeit über Triolandren dargelegt (Tschopp u. Meier).

Hinsichtlich wiederholter Gabe einer solchen Mischung könnte man das Bedenken haben, daß der Gehalt an raschwirkenden Verbindungen bei dem eintretenden Wirkungsabfall eine zu rasche, bzw. eine zu starke Wirkung ergeben könnte. Da aber nach den vorstehend dargelegten Experimenten in diesem Falle eine Reduktion der Dosis zu erfolgen hat, um ein konstantes Wirkungsniveau zu erreichen, besteht diese Schwierigkeit nicht; auch für die Fortsetzung der Wirkung ist somit eine solche Kombination, die einen langwirkenden Ester enthält, in relativer kleinerer Dosis als die primär notwendige durchaus geeignet.

Zusammenfassung

Die für die Erhaltung eines konstanten Wirkungsniveaus notwendige Dosierung wird für Testosteronester am Kapaun ermittelt. Ein Kammwachstum mittlerer Größe, das z. B. durch die Gabe von 10 mg Testosteron-isobutyrat erzielt wird, kann auf dem erreichten Niveau durch weniger als ein Viertel der primären Dosis der gleichen Verbindung erhalten werden. Die dadurch notwendige Herabsetzung der Dosis bedingt eine unerwünscht kurze Wirkungsdauer. Die Gabe einer in ihrer Resorptionsgröße dieser Dosis entsprechende höhere Dosis eines möglichst langwirkenden Esters, Testosteron-undecylenat, läßt eine wesentlich verlängerte Wirkung mit besonders konstantem Niveau erreichen.

Die allgemeinen Schlußfolgerungen, die sich aus den mitgeteilten Tatsachen für die Erzielung eines konstanten Wirkungsniveaus und die Auswahl der geeigneten Verbindungen ergeben, werden erörtert.

Literatur

(1) Meier, R., u. E. Tschopp: Acta endocr. **17**, 278 (1954). — (2) Acta endocr. **19**, 11 (1955); — (3) Arch. exp. Path. u. Pharmakol. **226**, 532 (1955). — Tschopp E., u. R. Meier: Schweiz. Med. Wschr. **84**, 1392 (1954).

Prof. R. Meier, Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, Pharmazeutische Abteilung

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 80—89 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Professor Dr. G. Kuschinsky)

Der Einfluß von natürlichem und synthetischem Oxytocin auf endogene Kreatinin-Clearance, Salzausscheidung und Säureausscheidungsfähigkeit der Ratte und auf die Diurese des Menschen

Von
H. Brunner, G. Kuschinsky, O. Münchow und G. Peters*

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 27. Oktober 1956)

Oxytocin hat bei Ratten eine ausgeprägte diuretische, natriuretische und chloruretische Wirkung, die sich nach oraler Gabe von isotonischer NaCl-Lösung nachweisen läßt, bei durstenden Tieren aber wesentlich stärker ist (Brunner, Kuschinsky u. Peters, 1956a). Bei maximaler Wasserdiurese verschwindet die diuretische und die chloruretische Wirkung, während eine geringe natriuretische Wirkung erhalten bleibt. Da in den erwähnten Versuchen ein natürliches Oxytocinpräparat mit einem Gehalt von etwa 5% Vasopressin (pressorische Wirkung) verwandt worden war, wurde untersucht, ob die beobachteten diuretischen und saluretischen Oxytocin-Wirkungen durch die im jeweils injizierten Oxytocin enthaltenen Vasopressin-Mengen verursacht werden konten: das war nicht der Fall (Brunner, Kuschinsky u. Peters, 1956b). Ausgeschlossen werden mußte unter diesen Umständen noch die Möglichkeit, daß die beobachteten Wirkungen von Oxytocin auf die renale Wasser- und Salzausscheidung nicht durch Oxytocin allein, sondern durch ein Zusammenwirken von Oxytocin mit den im verwandten Präparat enthaltenen kleinsten Vasopressin-Mengen bedingt sein könnte. Hierzu wurde die Wirkung des früher verwandten natürlichen Oxytocin-Präparats mit der eines synthetischen — zwar nicht durch Gegenstromverteilung gereinigten, aber sicher vasopressinfreien — Oxytocin-Präparats (Konzett, Berde u. Cerletti, 1956) verglichen. Ein solcher Vergleich war auch deshalb erforderlich, weil kürzlich (Brooks u. M. Pickford, 1956a) über Unterschiede in der natriuretischen Wirkung von natürlichem (vasopressinhaltigem) und synthetischem Oxytocin berichtet wurde.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Diuretische Wirkungen können entweder auf Steigerung der glomerulären Filtration oder auf Änderungen der Tubulusfunktion oder schließlich auf beiden Faktoren beruhen. Zur Analyse der diuretischen Oxytocin-Wirkung wurde der Einfluß von Oxytocin auf das Glomerulusfiltrat der Ratte untersucht; als Maß für das Glomerulusfiltrat wurde die Clearance des echten endogenen Kreatinins (Brunner, Kuschinsky, Münchow u. Peters, 1956a) unter der Einwirkung von Oxytocin bestimmt. — Außerdem wurde der Einfluß von natürlichem und synthetischem Oxytocin auf die Clearancen von Natrium, Kalium und Chlorid untersucht, um festzustellen, inwieweit die beobachteten Ausscheidungssteigerungen als renale Wirkungen des Hormons angesprochen werden dürfen. — Ebenso bedurfte die früher gefunde Hemmung der renalen Säureausscheidung durch Oxytocin einer näheren Untersuchung; deshalb wurde der Einfluß von Oxytocin auf die renale Säureausscheidung nach Säurebelastungen ermittelt.

Nachdem es früher (Brunner, Kuschinsky, Münchow u. Peters, 1956b) nicht gelungen war, bei gesunden normalen Menschen zu Beginn einer Durstperiode eine diuretische Wirkung von s. c. injiziertem natürlichem Oxytocin zu erzielen, wurde dieser Versuch jetzt an einer größeren Zahl längere Zeit durstender normaler Versuchspersonen mit synthetischem Oxytocin in höheren Dosen wiederholt.

Methodik

Vergleich der Wirkungen von natürlichem und synthetischem Oxytocin. Die Versuche wurden in der früher (Brunner, Kuschinsky u. Peters, 1956b) zur Bestimmung der Diurese von durstenden Ratten beschriebenen Weise ausgeführt. Die diuretische Wirkung wurde als Ausscheidung von Wasser in ml/Ratte innerhalb von 3 Std nach der subcutanen Injektion der zu vergleichenden Präparate gemessen. Die Nahrungs- und Wasserkarenz begann gleichzeitig mit der Injektion. Die Versuche wurden vormittags zwischen 9 und 13 Uhr ausgeführt. – Als natürliches Oxytocin-Präparat wurden wie in den früheren Versuchen Orasthin-Ampullen der Farbwerke Hoechst[1] verwandt; als synthetisches Oxytocin-Präparat dienten Syntocinon-Ampullen der Firma Sandoz A.G.[1]. Zur s. c. Injektion wurden die Präparate jeweils kurz vor Versuchsbeginn derart mit 0,9% NaCl-Lösung verdünnt, daß die Injektionsmenge pro Ratte 0,5 ml betrug. Das Wirkungsverhältnis von synthetischem zu natürlichem Oxytocin und seine Vertrauensgrenzen wurden nach den Methoden von Holton u. Schild in der Abänderung von Ginsburg (1951) aus der Wirkung auf die Wasserausscheidung berechnet. Neben diesem 4 Punkt-Verfahren kam in einem getrennten Versuch ein 6 Punkt-Verfahren (Gesler u. Matsuba, 1955) zur Anwendung: Da das gefundene Wirkungsverhältnis das gleiche wie beim 4 Punkt-Verfahren und lediglich die Vertrauensgrenzen etwas größer waren, kann auf die Wiedergabe dieses Versuchs verzichtet werden.

Bestimmung der Clearancen. Die echte endogene Kreatinin-Clearance sowie die Clearancen von Na^+, K^+ und Cl' wurden in der kürzlich beschriebenen Weise

[1] Beiden Firmen danken wir für die freundliche Überlassung größerer Versuchsmengen.

(Brunner, Kuschinsky, Münchow u. Peters, 1956a) bestimmt. Die Harnsammelperiode betrug genau 3 Std; die Blutentnahme erfolgte am Ende der Harnsammelperiode aus dem Schwanz. Oxytocin bzw. 0,9% NaCl-Lösung wurde in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml/Ratte zu Beginn der Harnsammelperiode s. c. injiziert. Im Unterschied zur früher beschriebenen Clearance-Bestimmungsmethode wurden hier die Clearancen bei Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz gemessen.

Säurebelastung. Nachdem sich herausgestellt hatte, daß die zur Anregung der renalen Säureausscheidung angegebene Dosis (Richards 1939) Ammoniumchlorid von 250 mg/kg i. p. bei 75% unserer Tiere beider Geschlechter innerhalb von 1—2 Std unter Krämpfen zum Tode führte, wurden orale Belastungen mit kleineren Mengen NH_4Cl versucht. ♂ und ♀ Ratten im Gewicht zwischen 180 und 280 g erhielten zweimal im Abstand von 2 Std je 4,0 ml 1,3% NH_4Cl-Lösung; d. h. insgesamt 2,0 mÄqu. NH_4Cl: auch diese Dosis führte noch bei mehr als der Hälfte der Versuchstiere zu Krämpfen und anschließender Prostration; sie wurde deshalb auf zweimal je 4,0 ml 0,65% NH_4Cl-Lösung im Abstand von 2 Std mit dreistündiger Harnsammlung im Anschluß an die zweite orale NH_4Cl-Gabe herabgesetzt. — Wegen der unbefriedigenden renalen Säureausscheidung nach Belastung mit Ammoniumchlorid wurde bei einer anderen Gruppe von männlichen und weiblichen Ratten im gleichen Gewicht eine Säurebelastung durch zweimalige orale Gabe von je 4,0 ml 1,8% NaH_2PO_4-Lösung im Abstand von 2 Std durchgeführt. Auch hier wurde der Harn von der zweiten Gabe ab für eine Dauer von 3 Std gesammelt. Die gegebene Gesamtmenge NaH_2PO_4 entspricht 1,20 mÄqu; wenn man das bei einem p_H von 7,4 bestehende Gleichgewicht von $H_2PO_4' \rightleftharpoons H^+ + HPO_4''$ zugrunde legt, entspricht diese Dosis 0,92 mÄqu „Säure" pro Ratte. Im Harn wurden Titrationsacidität und NH_4^+-Ionen nach den früher beschriebenen Methoden (Brunner, Kuschinsky, Peters, 1956b) bestimmt. Alle Säurebelastungsversuche wurden nachmittags und abends zwischen 15 und 20 Uhr durchgeführt.

Diureseversuche am Menschen. Die Versuche wurden an 10 freiwilligen gesunden Versuchspersonen (7 ♂ + 3 ♀) im Alter von 24 bis 36 Jahren von Mai bis Juli 1956 als Doppelblindversuche durchgeführt. An jeder Versuchsperson wurden 8 Versuche im Abstand von je einer Woche angestellt. Am Vorabend des Versuchstages wurde zwischen 18 und 19 Uhr mit einer leichten Mahlzeit ein Wasserstoß von 1,5 l Wasser, Tee oder Limonade gegeben: Von diesem Zeitpunkt an unterblieb jegliche Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme. Am nächsten Morgen wurde der Harn in einer Vorperiode von 9—10 Uhr gesammelt; dann wurde s. c. eine Injektion von Oxytocin oder von 0,9% NaCl-Lösung (der Versuchsperson und dem Injizierenden unbekannt) mit einem Gesamtvolumen von 2,0 –2,5 ml gegeben und anschließend der Harn 3 Std lang in Stundenportionen gesammelt. In allen 4 Harnportionen wurde jeweils Na^+, K^+, Cl' bestimmt. Als Oxytocin-Präparat wurde Syntocinon verwandt, das in folgenden 3 Dosen gegeben wurde: 15 mE/kg, 60 mE/kg und 240 mE/kg. Die gefundenen Wasser-, Na^+-, K^+- und Cl^--Ausscheidungen wurden jeweils 1. in % der Ausscheidung der Kontrollstunde vor der Injektion und 2. in % der Ausscheidung an denjenigen Tagen, an denen die jeweilige Versuchsperson (ohne ihr Wissen) nicht Oxytocin, sondern 0,9% NaCl-Lösung erhalten hatte, umgerechnet. Nur die Ergebnisse der letzteren Umrechnung werden angeführt; bezüglich der Oxytocin-Wirkung geben sie kein anderes Bild als die der erstngeführten Umrechnung.

Ergebnisse

1. Wirkungsvergleich von synthetischem und natürlichem Oxytocin. Zwischen der diuretischen Wirkung von natürlichem und synthetischem Oxytocin bei durstenden Ratten bestand kein Unterschied; Tab. 1 gibt

einen 4 Punkt-Wirkungsvergleich von Orasthin und Syntocinon, die beide in Dosen von 25 mE/Ratte und von 100 mE/Ratte s. c. gegeben wurden. Das Wirkungsverhältnis beträgt 1,00 mit Vertrauensgrenzen von 0,46—2,14. Die relativ weiten Vertrauensgrenzen sind durch Unterschiede in der Empfindlichkeit der einzelnen Ratten bedingt und lassen sich auch durch Anwendung einer größeren Tierzahl nicht verkleinern.

Tabelle 1. *4 Punkt-Wirkungsvergleich von Orasthin: Syntocinon*

Art der Streuung	Streuungszerlegung: Freiheitsgrad D. f.	Quadratsumme Sx^2	Varianz s^2	F	P
Regression	1	1,5822	1,5822	13,82	$< 0{,}001$
Abweichungen vom Parallelismus	1	0,4093	0,4093	3,58	$> 0{,}05$
Orasthin-Syntocinon	1	0,0000			
Rest	28	3,2045	0,1144		
Total	31	5,1960			

$M = 0{,}00123533—1$
$R = 1{,}00$
$b = +0{,}7387$
$s_M = 0{,}16192$
$s_M \cdot t = 0{,}3319$
Vertrauensgrenzen für $R = 0{,}46—2{,}14$

Gruppen von je 8 Ratten. Orasthin und Syntocinon in Dosen von 25 mE/Ratte und 100 mE/Ratte s. c. Als „Wirkung" wird das Harnvolumen in ml/Ratte innerhalb der 3 auf die Injektion folgenden Stunden angesehen. M = Logarithmus des Wirkungsverhältnisses; R = Wirkungsverhältnis; b = Regressionskoeffizient; s_M = Standardabweichung des logarithmischen Wirkungsverhältnisses; Vertrauensgrenzen = von Antilog $M - s_M \cdot t$ bis Antilog $M + s_M \cdot t$.

Auch in der Wirkung auf die Ausscheidung von Na^+, Cl^- und K^+ bestand zwischen natürlichem und synthetischem Oxytocin bei dursten-den Ratten keinerlei Unterschied; s. Abb. 1.

2. Clearance des echten endogenen Kreatinins. Es ließ sich keine signifikante Steigerung der endogenen Kreatinin-Clearance unter der Einwirkung von natürlichem oder von synthetischem Oxytocin nachweisen. In Tab. 2 ist die endogene Kreatinin-Clearance (in ml/Ratte/min) den jeweils erzielten Diuresesteigerungen gegenübergestellt. Die endogenen Kreatinin-Blutspiegel waren bei den mit Oxytocin behandelten Tieren nicht von denjenigen der Kontrollen unterschieden: eine getrennte Wiedergabe erübrigt sich.

3. Angriffspunkt der natriuretischen, chloruretischen und kaliuretischen Oxytocin-Wirkung. Weder synthetisches noch natürliches Oxytocin

steigert die Na^+-, K^+- oder Cl^--Plasmaspiegel. Die Ausscheidungssteigerungen gehen jeweils mit entsprechend großen Steigerungen der Clearancen einher. Die saluretischen Wirkungen von natürlichem sowie von synthetischem Oxytocin sind somit renaler Natur. S. Abb. 1.

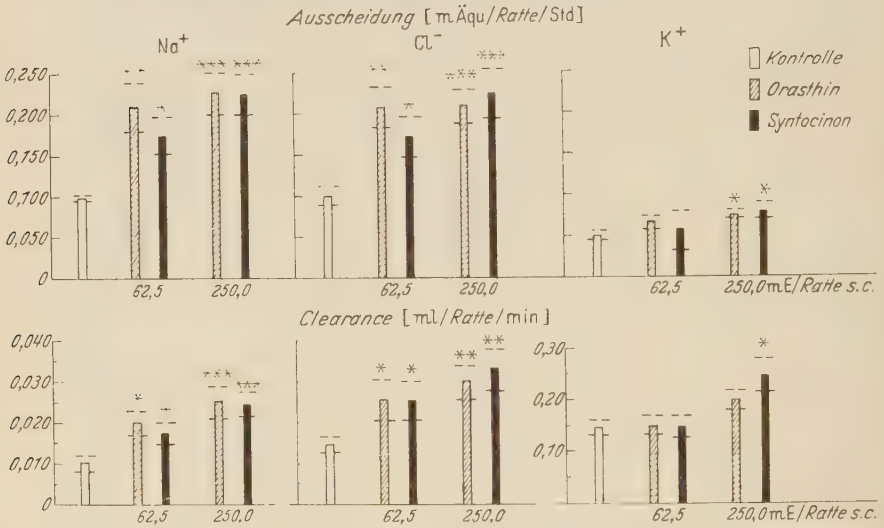


Abb. 1. Ausscheidung und Clearance von Na^+, Cl^- und K^+ bei durstenden Ratten nach Injektion von 0,5 ml 0,9% NaCl-Lösung oder von Orasthin oder Syntocinon in Dosen von 62,5 mE/Ratte oder 250,0 mE/Ratte in 0,5 ml Volumen

Die Säulen geben jeweils Mittelwerte von Gruppen von 15—17 Ratten, von denen jeweils ungefähr die Hälfte ♂, die Hälfte ♀ waren. Die seitlichen Striche an den Säulen bezeichnen $\pm$ 1 Standardabweichung der Mittelwerte ($s_{\bar{x}}$). Gestrichelte Säulen: natürliches Oxytocin (Orasthin); schwarze Säulen: synthetisches Oxytocin (Syntocinon), weiße Säulen = Kontrollen. Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Mittelwerten der behandelten Tiere und der jeweiligen Kontrollen
$* = P < 0{,}05$, $** = P < 0{,}01$, $*** = P < 0{,}001$
Ausscheidung in mÄqu/Ratte/Stunde; Clearance in ml/Ratte/min. Alle Werte aus Harnsammelperioden von 3 Std berechnet. Blutentnahme am Ende der Harnsammelperiode aus dem Schwanz

4. Ausscheidung von H^+ und NH_4^+ nach Säurebelastung. Die orale Gabe von zweimal 0,5 mÄqu NH_4Cl im Abstand von 2 Std führte in den 3 auf die zweite Gabe folgenden Stunden nicht zu einer signifikanten Steigerung der Titrationsacidität des Harns, wohl aber, wie zu erwarten, zu einer Steigerung der Ammonium-Ionenausscheidung. Außerdem hatte die NH_4Cl-Gabe eine starke diuretische Wirkung. (Tab. 3.) Da diese Form der „Säurebelastung" nicht zu einer eindeutigen Steigerung der renalen Säureausscheidung führte, wurde nicht versucht, sie durch Oxytocin zu beeinflussen.

Die orale Gabe von zweimal 0,6 mÄqu NaH_2PO_4 im Abstand von 2 Std führte in den 3 auf die zweite Gabe folgenden Stunden zu einer Steigerung der im Harn ausgeschiedenen Gesamttitrationsacidität auf ungefähr das $7^1/_2$fache der Norm. Mit dieser Steigerung der Säureausscheidung ging eine leichte Zunahme der Diurese einher. Die NH_4^+-Ausscheidung im Harn wurde durch die Gabe von saurem Phosphat

dagegen nicht gesteigert und erwies sich somit unter diesen Bedingungen als unabhängig von der Harnsäuerung.

Tabelle 2. *Wirkung von natürlichem und synthetischem Oxytocin auf die endogene Kreatinin-Clearance und die Diurese von durstenden Ratten*

Behandlung	Dosis mE/Ratte s. c.	Endog. Kreatinin-Clearance ml/Ratte/min	Diurese %	Tierzahl pro Gruppe
Kontrollen		1,22 ± 0,09	100 ± 10,6	12
Orasthin	62,5	1,25 ± 0,06	253,7 ± 23,4***	13
	250	1,33 ± 0,13	260,2 ± 35,6***	11
Syntocinon	62,5	1,29 ± 0,14	183,3 ± 22,6**	13
	250	1,38 ± 0,12	241,5 ± 38,2***	11

Clearance des echten endogenen Kreatinins in ml/Ratte/min. Diuresen jeweils in % des Mittelwertes der Harnausscheidung der Kontrollen am Versuchstag (vgl. Brunner, Kuschinsky u. Peters, 1956a). Signifikanzen der Unterschiede der Mittelwerte gegenüber unbehandelten Kontrollen wie in Abb. 1.

Tabelle 3. *Die Wirkung von oralen Gaben von Ammoniumchlorid und von primärem Natriumphosphat auf Diurese, Titrationsacidität und Ammonium-Ionenausscheidung im Harn der Ratte*

Belastung	Gesamtdosis mÄqu. p. o.	Diurese ml/Ratte/Std	H^+-Ausscheidung mÄqu/Ratte/Std	NH_4^+-Ausscheidung mÄqu/Ratte/Std
Kontrollen		0,43 ± 0,12(5)	0,013 ± 0,003(5)	0,034 ± 0,005(5)
NH_4Cl	1,0	1,39 ± 0,05(6)***	0,020 ± 0,003(6)	0,069 ± 0,007(6)**
NaH_2PO_4	1,2	0,79 ± 0,06(6)**	0,100 ± 0,008(6)***	0,033 ± 0,008(6)

Vorbehandlung und Verteilung der oralen Gaben s. Methodik. Kontrollen erhielten zweimal 4,0 ml 0,9% NaCl mit der Magensonde. Angaben in ml/Ratte/Std (Diurese) bzw. mÄqu/Ratte/Std (Titrationsacidität und NH_4^+-Ausscheidung). Angaben der Signifikanzen der Unterschiede zwischen belasteten Tieren und Kontrollen wie in Abb. 1. Tierzahlen jeweils in Klammern hinter den Werten.

Auf die Ausscheidung von H^+-Ionen und von NH_4^+-Ionen nach einer oralen Belastung mit primären Natriumphosphat hatten diuretisch wirksame Dosen von synthetischem Oxytocin keinen Einfluß (Tab. 4).

5. Wirkung von synthetischem Oxytocin auf Wasser- und Salzausscheidung normaler Versuchspersonen. Auch nach einem Wasserstoß mit anschließendem 14stündigem Hungern und Dursten läßt sich weder eine

Tabelle 4. *Einfluß von Syntocinon auf Diurese, Ausscheidung von H^+-Ionen und von NH_4^+-Ionen bei Ratten nach „Säurebelastung" mit NaH_2PO_4*

Behandlung	Dosis mE/Ratte s.c.	Diurese ml/Ratte/Std	H^+-Ausscheidung mÄqu/Ratte/Std	NH_4^+-Ausscheidung mÄqu/Ratte/Std
Kontrollen		0,95 ± 0,10(11)	0,085 ± 0,009(11)	0,048 ± 0,008(11)
Syntocinon	31	1,45 ± 0,13(9) **	0,082 ± 0,009(9)	0,040 ± 0,004(9)
	125	1,89 ± 0,20(10) **	0,083 ± 0,005(10)	0,050 ± 0,004(10)

Zeichen und Bezeichnungen wie in Tab. 3.

diuretische noch eine saluretische Wirkung von s. c. Injektionen von synthetischem Oxytocin nachweisen (Tab. 5). Die verschiedenen Injektionen von 0,9% NaCl-Lösung bzw. Syntocinon wurden subjektiv von den Versuchspersonen nur dann unterschieden, wenn die absolute Dosis 15,0 E überstieg. Bei denjenigen Individuen, bei denen die Dosis von 240 mE/kg einer absoluten Dosis von über 15,0 E entsprach, traten regelmäßig unangenehm empfundene Nebenwirkungen auf, die in dem Gefühl von Blutandrang zum Kopf, Rotwerden von Gesicht und Ohren, Schwindel, Übelkeit und anschließender Mattigkeit bestanden.

Tabelle 5. *Einfluß von synthetischem Oxytocin auf Wasser, Na^+-, K^+- und Cl^--Ausscheidung gesunder normaler Versuchspersonen nach 14stündigem Durst*

Syntocinon mE/kg K.G. s. c.	Ausscheidung von			
	Wasser% d. Kontroll-ausscheidung	Na^+ % d. Kontroll-ausscheidung	K^+% d. Kontroll-ausscheidung	Cl^- % d. Kontroll-ausscheidung
15	99 ± 8	112 ± 19	108 ± 8	101 ± 10
60	88 ± 6	100 ± 11	92 ± 6	92 ± 7
240	102 ± 8	128 ± 22	103 ± 6	107 ± 11

Versuchsanordnung s. Methodik. Alle Werte sind in % der Ausscheidung an den beiden Tagen ausgedrückt, an denen die jeweilige Versuchsperson nicht Oxytocin, sondern 0,9% NaCl s. c. erhalten hatte. Angabe: jeweils Mittelwert ± $s_{\bar{x}}$. Die Zahl der Versuchspersonen beträgt in allen Fällen 10. Jede Oxytocin-Dosis wurde an je 2 Tagen gegeben. Zwischen den Versuchen lag jeweils 1 Woche.

Diskussion

Die diuretische und saluretische Wirkung von natürlichem, etwas Vasopressin enthaltendem und künstlichem, sicher vasopressinfreiem Oxytocin unterscheiden sich nicht. Die diuretische Wirkung von Oxytocin ist daher allein diesem Hormon zuzuschreiben Ferner zeigt sich, daß im Gegensatz zu den Verhältnissen beim Hund unter bestimmten Versuchsbedingungen (Brooks u. Pickford, 1956a) an der Rattenniere synthetisches und natürliches Oxytocin wirkungsgleich sind. — Eine

Verstärkung der natriuretischen Wirkung von natürlichem Oxytocin durch gleichzeitige Gaben mittelgroßer Vasopressin-Dosen hatten wir schon früher nachgewiesen (Brunner, Kuschinsky, Peters, 1956a). Im Hinblick auf die sonstige Wirkungsgleichheit von natürlichem und synthetischem Oxytocin ist zu erwarten, daß sich eine derartige Verstärkung auch bei der Ratte bei einer Kombination von synthetischem Oxytocin mit Vasopressin nachweisen lassen wird, wie das beim Hund der Fall ist (Brooks, Pickford, 1956b).

Die Clearance des echten endogenen Kreatinins darf zur Zeit bei der Ratte mit dem gleichen Recht als Maß des Glomerulusfiltrats angesehen werden wie die Inulin-Clearance (Brunner, Kuschinsky, Münchow, Peters, 1956a). Unter der Voraussetzung, daß die endogene Kreatinin-Clearance auch unter diesen Umständen das Glomerulusfiltrat mißt, bedeutet ihre Unbeeinflußbarkeit durch Oxytocin, daß dessen diuretische und natriuretische Wirkungen tubulär bedingt sind. Sowohl synthetisches als auch natürliches Oxytocin hemmen demnach die tubuläre Rückresorption von Wasser, Natrium und Chlorid; über die Kaliumausscheidung läßt sich eine so sichere Aussage nicht machen, weil nach der derzeit herrschenden Ansicht das im Endharn auftretende Kalium ausschließlich tubulär sezerniert werden soll. — Dicker u. Heller (1946) hatten bei Ratten nach der Injektion eines natürlichen Oxytocin-Präparats in der Dosis von 30 mE/kg s. c. eine wesentliche Steigerung der Inulin-Clearance und der Diodrast-Clearance gefunden. Diese Steigerung war aber nicht durch Oxytocin, sondern durch die im Präparat enthaltenen kleinen Vasopressin-Mengen bedingt. Unter unseren Versuchsbedingungen ließ sich eine analoge Steigerung der endogenen Kreatinin-Clearance durch vasopressinhaltiges natürliches Oxytocin nicht nachweisen.

Auffällig ist der Befund, daß es anscheinend nicht gelingt, bei der Ratte durch orale Gabe von Ammoniumchlorid eine Harnsäuerung zu erzielen — zumal Ammoniumchlorid-Vorgaben als „Säurebelastung" bei Ratten schon verwandt worden sind (Dumm, Leslie u. Ralli, 1955). Eine Prüfung der von den genannten Untersuchern für die Säureausscheidung angegebenen Werte zeigt aber, daß bei ihren normalen Ratten nach einer oralen Gabe von 15 mÄqu/kg Körpergewicht NH_4Cl keine wesentlich höhere Ausscheidung von H^+-Ionen im Harn auftritt als bei unseren nicht mit NH_4Cl behandelten Kontrolltieren. — Die durch die Gabe von saurem Phosphat gesteigerte Säuresekretion der Nieren wird durch Oxytocin nicht beeinträchtigt; aus diesem Grund darf die früher gefundene Abnahme der H^+-Ionenausscheidung oxytocinbehandelter Ratten (bei längeren Harnsammelperioden) wohl kaum als renale Wirkung angesehen werden; sie könnte eine Stoffwechselwirkung darstellen.

Das Fehlen einer diuretischen oder saluretischen Wirkung von s. c. gegebenem Oxytocin bei gesunden normalen Versuchspersonen liegt anscheinend nicht — wie ursprünglich vermutet (Brunner, Kuschinsky, Münchow u. Peters, 1956b) — daran, daß Oxytocin nur im Zustand der „Grunddiurese" stark diuretisch wirkt. Möglicherweise werden für eine diuretische Wirkung am Menschen höhere Dosen benötigt, die aber wegen der Nebenwirkungen nicht gegeben werden können. Andererseits muß an die Möglichkeit gedacht werden, daß sich das tierische — und das konstitutionsgleiche synthetische — Oxytocin vom menschlichen Oxytocin unterscheiden, obwohl die beiden Erstgenannten auch auf den Uterus des Menschen wirken.

Summary

1. The diuretic action in rats as well as the increased renal excretion of sodium, chloride and potassium caused by natural oxytocin (containing 5 per cent vasopressin) has been compared with the action of an unpurified preparation of synthetic oxytocin (containing no vasopressin). Their actions have been found to be similar and the potency ratio of the two substances was 1.00 (fiducial limits 0.46—2.14).

2. In the rat the renal clearance of endogenous "true" creatinine was not affected by subcutaneous injections of 62.5—250.0 mU/animal of either natural or synthetic oxytocin.

3. The increased excretion of sodium, chloride and potassium caused by both types of oxytocin was probably due to an action of the hormone on the renal tubules; the clearances of these ions were affected similarly as their urinary excretions.

4. In rats no increase in the urinary excretion of titratable acidity could be brought about by the oral administration by stomach tube of 1.0 mEq ammonium chloride. Higher doses of ammonium chloride produced convulsions.

5. Oral administration to rats of 1.20 mEq NaH_2PO_4 caused a considerable increase in the excretion of titratable acidity. This increase was not accompanied by an increase in ammonia excretion. Oxytocin had no effect on the excretion of titratable acidity after such an acid load.

6. After a thirst period of 14 hours human volunteers were injected subcutaneously with 15 to 240 mU/kg. B. W. of synthetic oxytocin. The injection failed to cause an increase in diuresis or in excretion of sodium, chloride or potassium.

Wir danken Herrn Dr. Dr. H. Kathen für die Ausführung eines Teils der Kreatininbestimmungen im Blut. Frl. E. Middendorf und Frl. R. Engel danken wir für fleißige Mitarbeit und die Ausführung zahlreicher Bestimmungen.

Literatur

Brooks, F. P., and M. Pickford: The influence of posterior lobe hormones on the excretion of Na and K in the conscious dog. J. of Physiol. **131**, 33 P (1956a). The effect of oxytocin and vasopressin on the excretion of Na, K and Cl by the kidney. Abstr. Commun. XXth Internat. Physiol. Congr., Brüssel 1956, S. 130. — Brunner, H., G. Kuschinsky, O. Münchow und G. Peters: Der Tag-Nacht-Rhythmus der Diurese, Elektrolytausscheidung und Clearance des echten endogenen Kreatinins bei der Ratte. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 482 (1956). Der Einfluß von Oxytocin auf Diurese und Salzausscheidung bei Ratte und Mensch. Klin. Wschr. **1956**b, 451. — Brunner, H., G. Kuschinsky und G. Peters: Der Einfluß von Oxytocin auf die renale Wasser- und Salzausscheidung der Ratte. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 457 (1956a). Die Wirkung von Vasopressin auf die renale Wasser und Salzausscheidung der Ratte bei Veränderungen der Salzkonzentration des Trinkwassers und nach Nierenparenchymresektionen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 434 (1956b). — Dicker, S. E., and H. Heller: The renal action of posterior pituitary extract and its fractions as analysed by clearance experiments in rats. J. of Physiol. **104**, 353 (1946). — Dumm, M. E., S. H. Leslie and E. P. Ralli: Influence of adrenalectomy and gonadectomy on capacity of rats to excrete an acid load. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **88**, 592 (1955). — Gesler, R. M., and M. Matsuba: An experimental design for the biological assay of histamine using the guinea pig ileum. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **114**, 151 (1955). — Ginsburg, M.: A method for the assay of antidiuretic activity. Brit. J. Pharmacol. **6**, 411 (1951). — Konzett, H., R. Berde und A. Cerletti: Syntocinon, ein synthetisches uteruswirksames Hypophysenhinterlappenhormon. Schweiz. med. Wschr. **1956**, 226. — Richards, R. K.: Persönl. Mitteilung an H. G. O. Holck: In E. J. Farris, J. Q. Griffith jr: The Rat in Laboratory Investigation, 2. Auflage, J. B. Lippincott Comp. Philadelphia: 1949, S. 321.

Professor Dr. G. Kuschinsky, Pharmakologisches Institut der Universität Mainz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 90—106 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. Lendle)

Versuch eines experimentellen Nachweises von anaphylaktischen Reaktionen am sympathischen Ganglion

Von
G. Engelhardt und F. Roser

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. Oktober 1956)

Die Rolle des Nervensystems im Immunitäts- und Anaphylaxiegeschehen ist auch heute, mehr als 50 Jahre nach Entdeckung der Grundtatsachen der Anaphylaxie, noch Gegenstand der Diskussion. Es geht im wesentlichen um die Frage, ob anaphylaktische oder allergische Reaktionen, im Sinne der neuralpathologischen Lehren, spezifisch und primär über das Nervensystem ausgelöst werden oder aber, ob diese Reaktionen direkt am Erfolgsorgan, dem Kreislaufsystem und der übrigen glatten Muskulatur, ohne kausale Beteiligung des dort ortsständigen nervalen Gewebes, der Ganglien oder übergeordneter Schaltsysteme zustande kommen. Dabei ist die Frage, ob dem Nervensystem eine Koordinationsleistung im Ablauf des generalisierten Schocks am intakten Organismus zukommt, von sekundärer Bedeutung.

Wenn wir von der Bedeutung des Nervensystems für das anaphylaktische Geschehen sprechen, so müssen wir grundsätzlich unterscheiden zwischen der Bedeutung des Nervensystems für die Auslösung einer Antikörperbildung und deren Beeinflussung einerseits und der Rolle des Nervensystems im späteren Schockgeschehen andererseits.

In den ersten Jahren der experimentellen Anaphylaxieforschung wurden Beziehungen zwischen Nervensystem und Antikörperbildung abgelehnt (Biedl u. Kraus, 1911). Doerr definierte im Jahre 1922 für die klassische Serumanaphylaxie den Primärreiz, der eine Antikörperbildung auslöst, als eine direkte Reizung der einzelnen Endothelzellen durch das Antigen. Wenig später versuchte Reitler und ebenso Baschenin, experimentelle Beweise für die Bedeutung des Nervensystems für die Einleitung der Antikörperproduktion zu erbringen. Sie stellten die Immunkörperbildung als Reflexvorgang dar. Bogendörfer konnte nach Halsmarkdurchschneidung bei Hunden keine Antikörperbildung mehr auslösen und glaubte, daß die Antikörperbildung in ihren Anfängen einer Förderung durch den Sympathicus bedarf. Belák forderte auf Grund eigener experimenteller Arbeiten ein Vorherrschen des Parasympathicotonus für das Zustandekommen einer Antikörperbildung.

Went u. Lissak konnten nach totaler Sympathektomie nach Cannon keine Veränderung der Antikörperbildung feststellen. Went lehnt die Forderung eines Nervenreizes für die Antikörperbildung ab. Tusch u. Moser konnten mit Hilfe des Sanarellischen Phänomens an halsmarkdurchschnittenen Meerschweinchen die Befunde von Bogendörfer bestätigen.

Goreczky u. Klinkhart konnten durch Pilocarpinvorbehandlung der Versuchstiere eine Verstärkung der Antikörperbildung, durch Vorbehandlung mit Ephedrin eine Abschwächung der der Erstinjektion folgenden Antikörperbildung beobachten. Enenkel u. Pedal (1; 2) sahen bei mit Ephedrin vorbehandelten Kaninchen einen höheren Antitoxintiter als bei nichtbehandelten bzw. mit Pilocarpin behandelten Tieren. Stickl u. Kerstein halten ebenfalls die vegetative Tonuslage im Augenblick des ersten Kontaktes des Antigens mit dem Organismus für wesentlich für das Ausmaß der Beantwortung des Antigenreizes.

Daß auch ohne Vorhandensein von nervalen Elementen eine Antikörperbildung grundsätzlich möglich ist, ergibt sich aus Versuchen mit Gewebekulturen, in denen die Bildung von Antikörpern nachgewiesen werden konnte (Meyer u. Löwenthal, Sato, Masuda, Fagraeus u. a.).

Die Beobachtung, daß es möglich ist, an 3 Tage alten Hühnerembryonen Immunitätsvorgänge auszulösen (Wittich, Woratz u. Jensen, Engelhardt u. Lendle) machen es unwahrscheinlich, daß zur Auslösung einer Antikörperbildung die Anwesenheit funktionstüchtigen Nervengewebes erforderlich ist. Wilde weist darauf hin, daß die Fähigkeit, spezifische Abwehrstoffe in einem Antigen-Antikörpersystem zu bilden, auch Pflanzen, die bekanntlich kein Nervensystem haben, eigen ist, wie Gäumann, Braun u. Bazzigher an der Archis militaris unter dem Einfluß von Rhizoctonia repens nachweisen konnten.

Nach diesem Überblick über die Literatur mit den einander sehr widersprechenden Angaben scheint uns ein intaktes Nervensystem keine grundsätzliche Voraussetzung für die Antikörperbildung. Doch scheint eine regulierende Einflußnahme auf das Ausmaß der Antikörperbildung vom Nervensystem her möglich zu sein.

Auch für die Bedeutung des Nervensystems beim Zustandekommen des anaphylaktischen Schocks finden sich in der Literatur ebenso zahlreiche sich einander widersprechende Befunde.

Pottinger machte den Vagusreiz für den Schock verantwortlich, obgleich schon vor ihm Schürer u. Strasmann bei Versuchen an Meerschweinchen und Kaninchen gezeigt hatten, daß weder die Decerebrierung noch die Durchtrennung des Halsmarkes und das Durchschneiden beider Vagi es verhindern konnten, daß die Tiere akut im Schock ad exitum kamen. Dies steht im Einklang mit den Arbeiten von Bogendörfer sowie von Tusch u. Moser. Arnoldi u. Leschke setzen den anaphylaktischen Schock einer Erregung der parasympathischen Nervenendigungen an glattmuskeligen Organen gleich. Spiegel u. Kubo halten an der Mitbeteiligung der Nervenzellen bei der Auslösung des anaphylaktischen Schocks, wenn auch in untergeordneter Rolle, fest. Kalbfleisch, als unbeirrbarer Verfechter der Rickerschen und Speranskyschen Lehren, formuliert sehr scharf, daß ohne Beteiligung des Nervensystems keine anaphylaktische Reaktion möglich ist. Nakamura u. Takahashi kommen auf Grund pharmakologischer Untersuchungen zu der Annahme, daß die anaphylaktische Reaktion im Terminalreticulum abläuft. Dem widersprechen neuere Befunde von Schmidt, der durch pharmakodynamische Versuche zu dem Schluß kommt, daß das vegetative Nervensystem für die anaphylaktische Reaktion nicht notwendig ist. Storck will durch Ganglienblocker eine

ekzematöse Sensibilisierung verhindern können. Ajo fand, daß die lokale Anaphylaxie unabhängig von dem Zustand des peripheren Nervensystems ist. Heim wollte eine Sensibilisierung des Herzvagus bei der Anaphylaxie beobachtet haben. Seine Befunde konnten von Göing u. Hackenberg nicht bestätigt werden.

Der direkte Beweis, daß das vegetative Nervensystem keine Bedeutung für die Auslösung und den Ablauf der anaphylaktischen Reaktion besitzt, wurde erstmals an denervierten Organen erbracht. Seastone u. Rosenblueth registrierten auch an der denervierten Nickhaut der Katze im anaphylaktischen Schock eine Kontraktion. Lissak u. Hodes kamen nach vollständiger Sympathektomie zum gleichen Ergebnis. Bender denervierte die Iris verschiedener Species und fand trotzdem eine Miosis im anaphylaktischen Schock. Einen gleichen direkten Beweis bringen die Arbeiten von Seelich u. Stockinger an Gewebekulturen. Schließlich konnten auch Engelhardt u. Lendle an dem physiologischerweise nervenfreien Hühneramnion anaphylaktische Reaktionen nachweisen.

Auch für die Auslösung des anaphylaktischen Schockes kann somit dem vegetativen Nervensystem, trotz einiger gegenteiliger Angaben in der älteren Literatur, keine primäre Bedeutung zuerkannt werden.

Dennoch bleibt zu untersuchen, wieweit das Nervensystem mit eigenen Reaktionen am anaphylaktischen Geschehen teilnimmt. Diese Frage kann nur dadurch geklärt werden, daß man *Nervengewebe direkt als Schockorgan* zu benutzen versucht. Auch eine Nervenzelle müßte, wenn sie mit Antikörpern beladen ist, unter der Antigen-Antikörperreaktion mit der ihr eigenen Funktionsäußerung reagieren. Es ist nicht einzusehen, warum die Forderungen von Kallós für die Drüsen- und Muskelzelle nicht auch auf die Ganglienzelle übertragbar sein sollten, besonders wenn man mit Seelich annimmt, daß die Antigen-Antikörperreaktion in der Zelle primär zu physikalisch-chemischen Zustandsänderungen führt.

Die Zahl der experimentellen Arbeiten, die sich mit der direkten Beobachtung der Lebensäußerung von Nervengewebe im anaphylaktischen Schock befassen, ist nicht groß.

Spiegel u. Kubo hielten die nach kleinsten in die Carotis injizierten Antigendosen beobachtete Blutdrucksenkung für eine primäre spezifische Reaktion des Vasomotorenzentrums. Stief u. Tokay sahen nach der experimentellen Serumanaphylaxie bei verschiedenen Species histologische Veränderungen an zentralen Ganglien. Gomirato konnte keine Steigerung der corticalen Aktivität im EEG im anaphylaktischen Schock des nicht narkotisierten Kaninchens nachweisen. Dagegen konnte Brandon neuerdings zeigen, daß der anaphylaktische Schock an Meerschweinchen und Ratten zu erheblichen pathologischen Veränderungen im EEG und EMG führt. Er sah im EEG diffus mehr oder weniger generalisierte Entladungen vom epileptiformen Typ, im EMG selbst des durchtrennten Spinalmarks pathologische schnelle und langsame Aktivität.

Chauchard u. Chauchard leiten aus ihren Chronaxieversuchen an Kaninchen im anaphylaktischen Schock eine Erregung der Nervenfasern des vegetativen

Systems ab. Dieser primären Erregung soll eine zweite zentralen Ursprungs übergelagert sein, aus der am Sympathicus eine Erregung und am Parasympathicus eine Hemmung resultiert.

Für das Verständnis der Symptome des generalisierten anaphylaktischen Schocks wäre die Kenntnis einer Beteiligung vegetativer Ganglien an der anaphylaktischen Reaktion wertvoller als die Kenntnis der Verhältnisse im Zentralnervensystem. Versuche, ein peripheres autonomes Ganglion als Schockorgan zu benützen, sind uns aus der Literatur nicht bekanntgeworden.

In dem Ganglion cervicale craniale der Katze liegt ein Objekt vor, welches erlaubt, Veränderungen der Ganglientätigkeit, ohne Ableitung postganglionärer Aktionspotentiale an den Reaktionen der von ihm rein sympathisch innervierten Nickhaut (Cervoni, West u. Fink) zu registrieren. Dieses Präparat wird zur Testung ganglienwirksamer Pharmaka routinemäßig benutzt.

Ziel dieser Arbeit sollte der Nachweis von anaphylaktischen Reaktionen an diesem sympathischen Ganglion der Katze sein.

Methodik

Die klassischen Versuchstiere für die experimentelle Anaphylaxieforschung sind das Meerschweinchen und das Kaninchen. Die Katze wurde für solche Versuche nur relativ selten verwendet. Ein Grund dafür ist, daß die Katze nicht mit der gleichen Sicherheit zu einer Antikörperbildung angeregt werden kann. Die Symptomatologie des anaphylaktischen Schocks bei der Katze wurde von Manwaring, Schultz, Edmunds sowie Drinker u. Bronfenbrenner beschrieben. Sie konnten die erstmalig von Brodie beschriebene Beobachtung, daß auch unvorbehandelte Katzen im Gegensatz zu anderen Species eine primäre Überempfindlichkeit gegenüber Fremdseren besitzen, bestätigen. Die Schwierigkeit, die echten anaphylaktischen Reaktionen von Symptomen der primären Sensibilität gegenüber Fremdseren abzugrenzen, mag ein weiterer Grund für die seltene Verwendung der Katze für Anaphylaxieversuche sein. Die primäre Überempfindlichkeit ist gegen Hammel- und Hundeserum am geringsten.

a) Maßnahmen zur Sensibilisierung. Als Antigen benutzten wir bei einer Gruppe von Tieren natives Hammelserum der Behring-Werke. Bei einer zweiten Gruppe verwendeten wir selbstgewonnenes Hundeserum, das einheitlich in Herkunft und Aufbereitung war. Die Tiere erhielten 5mal jeden zweiten Tag je 1 ml des betreffenden Serums i.m. bzw. s.c. injiziert. Die Inkubationszeit betrug im Minimum 17 Tage vom Tage der letzten Injektion an gerechnet.

b) Prüfung auf den Erfolg der Sensibilisierung. Der Erfolg der Sensibilisierung sollte kontrolliert werden durch Bestimmung des Präcipitationstiters, die Prüfung einer Schultz-Daleschen Reaktion am im akuten Versuch entnommenen Dünndarmsegment und durch den Blutdrucktest im akuten Versuch. Eine fortlaufende Bestimmung des Präcipitationstiters scheiterte an der Schwierigkeit der mehrmaligen Venenpunktion an der nicht narkotisierten Katze. Wir bestimmten deshalb den Präcipitationstiter nur am Tage des akuten Versuches wie folgt: In Anlehnung an die Anweisung von Uhlenhuth u. Steffenhagen wurde eine fortlaufende Verdünnungsreihe des antigenen Serums in 1,2%iger NaCl-Lösung unterschichtet mit gleichbleibenden Mengen einer 1:2 Verdünnung des antikörperhaltigen Serums.

10 min nach Unterschichtung bei Zimmertemperatur wurde der Titer als Grenzkonzentration des antigenen Serums, bei dem noch Ringbildung bzw. Trübung aufgetreten war, abgelesen. In 3 Fällen gelang es trotz schärfsten Zentrifugierens des Katzenserums nicht, dieses für eine einwandfreie Titerbestimmung verwendbar zu machen.

Der Blutdrucktest im akuten Versuch wurde dann als positiv bewertet, wenn die i.v. Injektion einer größeren Menge antigenen Serums eine länger anhaltende Blutdrucksenkung vergesellschaftet mit einer vorübergehenden Bradykardie zur Folge hatte, und wenn bei einer zweiten gleichartigen Injektion der entsprechende Erfolg ausblieb (Desensibilisierung).

c) Versuchsplan. Es kam uns bei diesen Versuchen darauf an, das Antigen in kleinen Mengen isoliert dem Ganglion zuzuführen. Die in solchen Fällen verwendete Methode nach Kibjakow oder einer ihrer Modifikationen kam wegen der nur kurzen Überlebensdauer dieses Präparates für uns nicht in Betracht. Das Ganglion sollte deshalb in der normalen Blutversorgung belassen werden. Die gezielte Zufuhr zum Ganglion hatte deshalb auf dem kürzesten Weg zu den Abgängen der Gefäße für das Ganglion intraarteriell zu erfolgen. Zur Differenzierung einer Wirkung am Ganglion, die an der zugehörigen Nickhaut abgelesen werden sollte, von einer direkten Wirkung des Antigens an der Nickhaut, wie sie von Seastone u. Rosenblueth sowie von Lissak u. Hodes beschrieben wird, mußte verhindert werden, daß das Antigen, das dem Ganglion zugeführt werden sollte, an die Nickhaut abströmt. Zur Kontrolle für auf dem Blutweg an der Nickhaut zustande kommende Reaktionen mußte die direkte Blutversorgung der Nickhaut auf der Gegenseite intakt bleiben. Traten an beiden Nickhäuten Reaktionen auf, trotz isolierter Antigenapplikation ins Ganglion, war aus der zeitlichen Differenz des Auftretens der Reaktion eine Unterscheidung zwischen ganglionärer und rein muskulärer Erregung möglich.

Da es zunächst ungewiß war, ob die anaphylaktische Reaktion im Ganglion zu einer Förderung oder Abschwächung der Aktivität des Ganglions führen würde, wurde präganglionär elektrisch untermaximal gereizt.

d) Akuter Versuch. Der akute Versuch wurde in Chloralose-Urethan-Narkose (Chloralose 60 mg/kg + Urethan 250 mg/kg s.c.) vorgenommen. Eine reine Chloralosenarkose, wie sie für solche Versuche wünschenswert wäre, hätte den Nachteil, daß jeder Reiz aus der Umgebung die Registrierungsbedingungen stören würde.

Nach Einbinden eines Katheters in die V. femoralis sin. und einer Trachealkanüle wurde ein Dünndarmsegment für den Schultz-Daleschen Versuch durch Laparatomie gewonnen. Nach Unterbindung der V. pharyngica transversa anterior wurde die A. occipitalis in Nachbarschaft des N. hypoglossus aufgesucht und ein Polyäthylenkatheter mit einem Außendurchmesser von 0,6 mm möglichst kurz eingebunden. Wir gaben im Gegensatz zu Trendelenburg, der die A. lingualis benutzte, der A. occipitalis nach Studium der vergleichenden anatomischen Arbeit von Chungcharoen, Daly u. Schweitzer den Vorzug, da aus ihr — und in unmittelbarer Umgebung ihres Ursprungs — die das Ganglion versorgenden Arterien abgehen. Kibjakows Darstellung der arteriellen Versorgung des Ganglion cervicale cran. der Katze ist nach diesen neueren Arbeiten wenig brauchbar. Die A. carotis ext. wurde unterhalb des Abganges der A. lingualis unterbunden. Nach Möglichkeit wurden stärkere Seitenäste der A. carotis comm. ebenfalls unterbunden. Die Nn. sympathici wurden im Halsbereich von den Nn. vagi und den Nn. depressores abgetrennt und mit Hilfe eines mit Paraffinum liqu. getränkten Gazetupfers in den Reizelektroden an korrespondierenden Stellen fixiert.

Nach Anheften der Ober- und Unterlider beiderseits wurden die Nickhäute am knorpeligen Rande angeschlungen. Die Bewegungen der Nickhäute wurden über

jeweils zwei Rollen als Fadenzug auf zwei am Rußkymographion schreibende Stirnschreiber übertragen. Das Übersetzungsverhältnis betrug jeweils 1 : 11, die Belastung jeweils 10 g. Die Blutdruckregistrierung erfolgte aus der A. femoralis sin. blutig mittels Mareyscher Kapsel am gleichen Rußkymographion. Die Blutdruckkanüle war mit Heparin-Ringer-Lösung gefüllt. Da Heparin in hohen Dosen den anaphylaktischen Schock verhindern kann, wurde der Übertritt der blutgerinnungshemmenden Lösung in größeren Mengen in den Kreislauf vermieden.

Für die präganglionäre Reizung[1] benutzten wir Serien von Rechteckimpulsen. Die Impulsdauer betrug 0,6 bzw. 0,8 msec. Als Reizfrequenzen wählten wir solche,

Tabelle 1. *Kontrollen mit Hammelserum an Normaltieren*

	Gewicht	Intraarterielle Injektion: Menge und Verdünnung des Serums		Wirkung am Ganglion	Intravenöse Injektion: Menge des Serums	Blutdruckwirkung	Bradykardie	Nickhautwirkung
1.	2740 g	0,5	1 : 50	0				
		0,3	1 : 10	0				
		1,0	1 : 10	0				
2.	2530 g	0,2	unverd.	0	2,0	kurz	0	(+)
		0,3	unverd.	+				
3.	2480 g	0,3	unverd.	+	2,0	kurz	0	+
		0,3	unverd.	0				
4.	2700 g				2,0	kurz ++	+	+
					2,0	0	0	0
5.	3860 g	0,2	unverd.	(+)	2,0	0	0	0
		0,4	unverd.	0				
6.	2350 g	0,3	1 : 10	0	1,0	0	0	0
		0,3	unverd.	0				

wie sie von Folkow für autonome Nerven bei Kontrolle der Gefäßperipherie und Nickhaut als physiologisch gefunden wurden, nämlich 2 bzw. 5 Imp/sec. Die Reizstärke wurde auch bei diesen niederen Frequenzen untermaximal gehalten. Zur Sicherung der Ergebnisse, die mit dieser an sich Kritik herausfordernden Methode der untermaximalen Reizung erhalten wurden, werteten wir nur solche, bei denen der Reizerfolg in mehreren aufeinanderfolgenden Reizserien keine wesentlichen Änderungen zeigte. (Bekanntlich kann es bei untermaximaler Reizung schon durch geringfügige Veränderungen der Elektrodenlage oder des Ionenmilieus um den Nerven zu erheblichen Veränderungen des Reizerfolges kommen.)

Die Dauer der Impulsserien betrug zwischen 1½ und 3 min. Die Pausen zwischen den Impulsserien waren im allgemeinen ebenso lang. Mitunter war es bei längeren Reihen von Impulsserien nicht zu vermeiden, daß bei vom Reizgerät konstant gehaltener Reizqualität die Reizerfolge langsam und kontinuierlich spontan abnahmen und zu einer erneuten Einstellung der Reizstromstärke zwangen.

[1] Als Reizgerät verwendeten wir die Geräte „Medeor" und „Megatest". Für ihre Überlassung danken wir an dieser Stelle der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Tabelle 2. *Gegen Hammelserum sensibilisierte Tiere*

	Gewicht	Inkubationszeit	Titer	Schultz-Dale-Versuch	Intraarterielle Injektion: Menge und Verdünnung d. Serums	Intraarterielle Injektion: Wirkung am Ganglion	Intravenöse Injektion: Menge des Serums	Intravenöse Injektion: Wirkung am Blutdruck	Intravenöse Injektion: Bradykardie	Intravenöse Injektion: Nickhautwirkung
1.	2370 g	45 Tg	1 : 64	+	0,5 1 : 10	+	1,0	kurz	+	+
					0,5 1 : 10	+	0,9	(+)	0	0
					0,15 unverd.	+				
2.	2645 g	47 Tg	1 : 256	-	0,1 unverd.	+	1,0	0	0	0
					0,2 unverd.	0				
3.	1690 g	53 Tg	1 : 256	(+)	0,3 unverd.	0	1,0	kurz	+	0
							1,0	kurz	0	0
4.	2800 g	17 Tg	1 : 32	-	0,2 unverd.	+	1,0	kurz	0	0
					0,3 unverd.	0				
5.	2650 g	23 Tg	1 : 256	—	0,3 unverd.	+	2,0	kurz	0	+
							2,0	0	0	0
6.	3560 g	25 Tg	1 : 32	-	0,3 unverd.	0	2,0	kurz	+	0
							2,0	kurz	0	0
7.	3480 g	33 Tg	1 : 32	-	0,25 unverd.	0	2,0	kurz	0	0
8.	3050 g	40 Tg	>1 : 1000	-	0,6 1 : 3	0	2,0	kurz 10 min um 20 mm Hg	+	+[1]
					0,3 unverd.	+	2,0	0	0	0
9.	2010 g	27 Tg	>1 : 512	+	0,2 unverd.	0	2,0	kurz 4 min auf 20 mm Hg	+	[1] +
					0,2 unverd.	+	2,0	kurz	0	+
							2,0	kurz	0	+
							2,0	kurz	0	0

Bei unseren Versuchen zum Nachweis einer anaphylaktischen Organreaktion des Ganglion cervicale gliederte sich der typische Versuchsablauf in folgenden Phase: Zunächst wurde für jedes Ganglion diejenige Reizstromstärke bestimmt, die zu einem $^1/_3$ bis $^1/_2$ maximalen Reizerfolg, gemessen an der Nickhautkontraktion, führte. Sodann wurde durch Injektion gleichbleibender Mengen von Acetylcholin (5–20 γ) festgestellt,

Tabelle 3. *Kontrollen mit Hundeserum an Normaltieren*

	Gewicht	Intraarterielle Injektion: Menge und Verdünnung des Serums		Intraarterielle Injektion: Wirkung am Ganglion	Intravenöse Injektion: Menge des Serums	Intravenöse Injektion: Wirkung am Blutdruck	Intravenöse Injektion: Bradykardie	Intravenöse Injektion: Nickhautwirkung
1.	3630 g				2,0	0	0	0
					3,0	kurz	0	(+)
2.	3480 g	0,4	1 : 10	0	3,5	1 : 10 0	0	0
					2,5	kurz u. langsamer Abfall	+	+ + +
					2,5	0	0	(+)
3.	2620 g	0,5	1 : 10	0	2,0	0	+	0
		0,5	unverd.	+				
		0,5	unverd.	0				
4.	3720 g	0,5	1 : 10	0	2,5	kurz	0	0
		0,5	unverd.	+				
		0,5	unverd.	0				
5.	2855 g	0,5	1 : 10	0	3,0	kurz	+	+ + +
		0,5	unverd.	+ +	2,0	0	0	
		0,5	unverd.	+ +				
6.	2770 g	0,5	1 : 10	0	1,5	kurz	+	(+)
		0,5	1 : 5	+	3,0	kurz, starker Abfall, 6 min erniedrigt um 30 mm Hg	+	+ + +
		0,5	1 : 2	+	3,0	0	0	0
7.	2860 g	0,3	unverd.	0	2,2	kurz	+	
		0,6	unverd.	+				

ob die gezielte Applikation ins Ganglion gewährleistet war. Da gleichbleibende Mengen verwendet wurden, konnte dadurch die Lage des Katheters in der A. occipitalis bis zum Erreichen eines Optimums korrigiert werden. Im Anschluß daran wurde das antigene Serum in schiedener Verdünnung mit Ringer-Lösung ins Ganglion langsam injiziert. In jedem Falle wurde hiernach der Blutdruck-Test durch i.v. Injektion größerer Mengen unverdünnten Antigen-Serums ausgeführt. Um das anaphylaktische Geschehen nicht in einer nicht zu kontrollierenden Weise

Tabelle 4. *Gegen Hundeserum sensibilisierte Tiere*

	Gewicht	Inkubationszeit	Titer	Schultz-Dale-Versuch	Intraarterieller Injektion: Menge u. Verdünnung d. Serums	Intraarterieller Injektion: Wirkung am Ganglion	Intravenöse Injektion: Menge des Serums	Intravenöse Injektion: Wirkung am Blutdruck	Intravenöse Injektion: Bradykardie	Intravenöse Injektion: Nickhautwirkung
1.	2725 g	36	>1:2000	+	0,5 1:10	+	2,5	bleibt auf 40 mm Hg	++	+[2]
					0,5 1:5	+	2,5	0	0	(+)
2.	3360 g	37	>1:128	+	0,5 1:10	0	2,5	kurz	+	+
					0,5 1:2	+		bleibt auf 50 mm Hg		
					0,5 unverd.	0	2,5	0	0	0
3.	3500 g	36	>1:1000	+	0,5 1:10	0	2,5	kurz	+	+[3]
					0,5 1:5	+		bleibt auf 60 mm Hg		
					0,5 1:5	0				
					0,5 unverd.	+[1]	2,5	0	0	+
					0,5 unverd.	+				
4.	3820 g	38	1:64	+	0,5 1:10	+	2,5	kurz	+	+++
					0,5 1:10	+	2,5	kurz	0	+++
					0,5 1:5	0	5,0	kurz	0	+++
5.	2110 g	40	0	+	0,5 1:20	+	1,8	kurz Abf.	+	+++
					0,5 1:20	0		kurz Anst. langs. Abf. auf 70 mm Hg		
					0,5 1:10	0	1,8	kurz	0	+
					0,5 1:3	0	2,0	kurz	0	+
					0,3 unverd.	(+)				

[1] Danach langsamer kontinuierlicher Blutdruckabfall.
[2] Vorübergehender Atemstillstand.
[3] Ausgeprägte Bradypnoe.

zu beeinflussen, wurden andere Stoffe als das Acetylcholin (Histamin, Serotonin, Nicotin) grundsätzlich erst nach Beendigung des Anaphylaxieversuches geprüft.

Ergebnisse

Unsere Untersuchungen erfolgten an insgesamt 27 Katzen, und zwar wurden unter 25 Tieren, die gegen Hammelserum sensibilisiert worden waren, 9 Tiere (Tab. 2), und von 9 Katzen, die gegen Hundeserum sensibilisiert worden waren, 5 (Tab. 4) zum Versuch ausgewählt. Das Verhalten von normalen, unvorbehandelten Tieren gegenüber Hammelserum

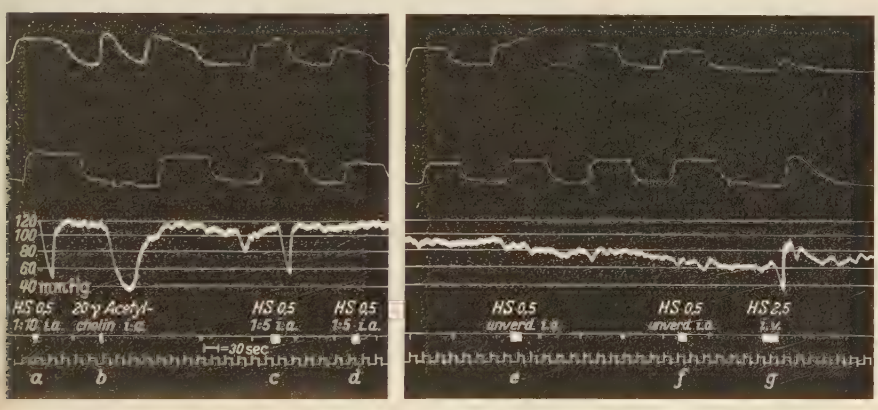


Abb. 1. Versuch am 16. 7. 1956 (Tab. 4, Nr. 3). Gegen Hundeserum sensibilisierte Katze 3500 g. Inkubationszeit 36 Tage. Titer > 1:1000, SCHULTZ-DALE am Dünndarmsegment positiv. Chloralose + Urethan-Narkose. Intraarterielle Injektion in die A. occipitalis sin. 1. Kurve: li. Nickhaut, 2. Kurve: re. Nickhaut, 3. Kurve: arterieller Blutdruck aus der A. femoralis sin. Zeitmarkierung: 30 sec

a) Hundeserum 0,5 ml 1:10 verd. i.a.: Ohne deutliche Wirkung auf den untermaximalen Reizerfolg li., kurzdauernder, starker Blutdruckabfall

b) Acetylcholin 20 i.a.: Deutliche Wirkung am unerregten Ganglion li. als Kriterium für die richtige Katheterlage

c) Hundeserum 0,5 ml 1:5 verd.: Steigerung des Reizerfolges li. unter der Injektion, kurzdauernder starker Blutdruckabfall

d) Hundeserum 0,5 ml 1:5 verd.: Hat keine Wirkung mehr auf den Reizerfolg, keine akute Wirkung auf den Blutdruck, jedoch danach langsamer kontinuierlicher Blutdruckabfall

e) Hundeserum 0,5 ml unverd. i.a.: Steigerung des Reizerfolges li. ohne akute Blutdruckwirkung

f) Hundeserum 0,5 ml unverd. i.a.: Nur noch geringe Steigerung des Reizerfolges

g) Hundeserum 2,5 ml unverd. i.v.: Nickhautwirkung bds., li. schwächer als re., bedingt durch Unterbindung der A. carotis ext. Akuter Blutdruckabfall mit Bradykardie, Gegenregulation

wurde an 6 Katzen (Tab. 1), das gegenüber Hundeserum an 7 Tieren (Tab. 3) in gleichartigen Versuchen kontrolliert.

In der Gruppe der gegen Hammelserum sensibilisierten Tiere waren am Versuchstage 2 Tiere (Nr. 1 und Nr. 9), gemessen am Serumtiter, dem positiven Ausfall der SCHULTZ-DALEschen Reaktion und am positiven Ausfall des Blutdrucktestes eindeutig sensibilisiert. Da der Serumtiter kein unbedingtes Maß für die Organsensibilisierung darstellt und

andererseits der Schultz-Dale-Test an einzelnen Dünndarmabschnitten sonst sicher sensibilisierter Katzen nicht selten negativ ist, ist die Zahl der als wirklich gegen das Hammelserum sensibilisiert anzusprechenden Tiere sicher höher anzusetzen.

In der Gruppe der gegen Hundeserum sensibilisierten Katzen (Tab. 4) sprachen immerhin bei 4 von 5 Tieren alle Kriterien für eine eindeutige Sensibilisierung.

In der Abb. 1 mag zunächst ein Versuchsbeispiel in kurzen Kurvenausschnitten vorgelegt werden, um den üblichen Verlauf der

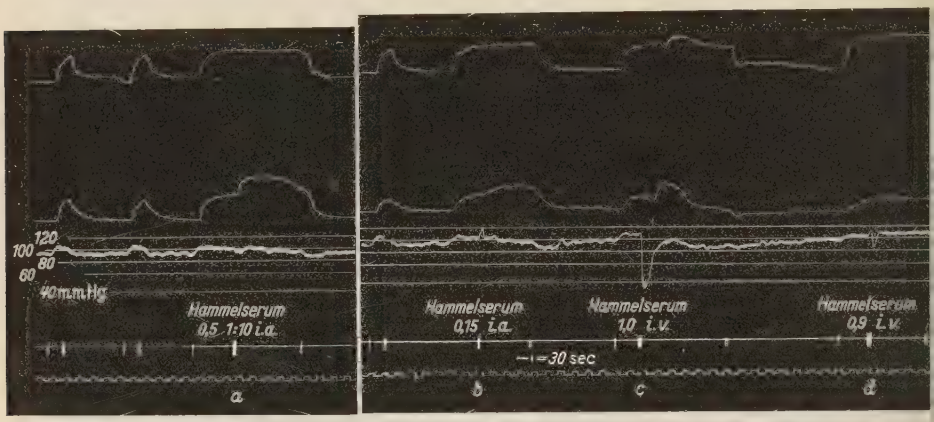


Abb. 2. Versuch vom 17. 12. 1955 (Tab. 2, Nr. 1), Ausschnitt. Gegen Hammelserum sensibilisierte Katze 2370 g. Inkubationszeit 45 Tage. Titer 1:64. Schultz-Dale-Test am Dünndarmsegment positiv. Chloralose-Urethan-Narkose. Intraarterielle Injektion in die A. occipitalis sinistra. 1. Kurve: re. Nickhaut, 2. Kurve: li. Nickhaut, 3. Kurve: arterieller Blutdruck aus der A. femoralis sin Zeitmarkierung: 30 sec

a) Hammelserum 0,5 ml 1:10 verd. i.a.: Starke Steigerung des untermaximalen Reizerfolges li.

b) Hammelserum 0,15 ml unverd. i.a.: Deutliche Wirkung auf den untermaximalen Reizerfolg li.

c) Hammelserum 1,0 ml unverd. i.v.: Vorübergehende Verstärkung der Nickhautkontraktion beiderseits (periphere Muskelwirkung); kurzdauernde Blutdrucksenkung mit vorübergehender Bradykardie

d) Hammelserum 0,9 ml unverd. i.v.: Keine erneute Kontraktion der Nickhäute (Desensibilisierung) bei noch angedeuteter Blutdruckreaktion

experimentellen Prüfung und die Art der Auswertung der Befunde zu zeigen.

Die wesentlichen Befunde der weiteren Versuche haben wir für die verschiedenen Gruppen in den Tab. 1—4 kurz zusammengestellt. Die Abb. 2 gibt noch den kurvenmäßigen Beleg für eines dieser Versuchsergebnisse.

Zur Anordnung der Befunde in den Tabellen sei folgendes erklärt: Die einzelnen Versuche sind in ihrer chronologischen Reihenfolge aufgeführt. Eine Anordnung nach der Länge der Inkubationszeit entfiel, weil bei unseren Versuchen kein direkter Zusammenhang zwischen der Inkubationszeit einerseits und der Höhe des Serumtiters,

dem Ausfall der Schultz-Daleschen Reaktion und dem Erfolg der Sensibilisierung, gemessen am Blutdrucktest andererseits, zu beobachten war.

Unter der Rubrik „intraarterielle Injektion" findet sich der ganglionäre Effekt des antigenen Serums aufgezeichnet, wobei die eventuelle kurze Nebenwirkung dieser kleinen Serummengen auf den Blutdruck nicht im einzelnen ausgewertet wurde. Aus der Spalte „intravenöse Injektion" ist entsprechend die Wirkung größerer Serummengen auf den Blutdruck, die Herztätigkeit und die direkte Wirkung auf die glatte Muskulatur der Nickhaut zu entnehmen.

Am unerregten Ganglion konnte durch eine Antigeninjektion niemals eine Erregung ausgelöst werden. Unter der Injektion der antigenen Seren kam es dagegen im präganglionär untermaximal gereizten Ganglion zu einer Verstärkung des Reizerfolges für die Dauer des Kontaktes mit dem Serum. Diese Wirkung des Serums sahen wir auch an den unvorbehandelten Kontrollen. Wegen der geringen quantitativen Unterschiede im Erfolg der Wirkung des als Antigen verwendeten Hammelserums am Ganglion zwischen vorbehandelten und unvorbehandelten Tieren und wegen des geringen Sensibilisierungserfolges wurde die zweite Gruppe mit Hundeserum sensibilisiert. Bei dieser Gruppe waren die Befunde am Ganglion qualitativ zwar die gleichen wie bei den Versuchen mit Hammelserum, jedoch ergaben sich deutliche quantitative Unterschiede in der Wirkung des antigenen Serums zwischen vorbehandelten und unvorbehandelten Tieren insofern, als bei den vorbehandelten Katzen wesentlich geringere Mengen des antigenen Serums zu einer Verstärkung des Reizerfolges führten.

Die Sicherung einer echten anaphylaktischen Wirkung am Ganglion selbst durch die Probe auf erfolgte Desensibilisierung war nicht möglich, weil bei den vorbehandelten Tieren nur selten eine akute Desensibilisierung zu beobachten war, andererseits aber bei den Kontrollen die Serumwirkung eine Tachyphylaxie zeigte. Der Befund der Potenzierung des Reizerfolges an dem auf die oben beschriebene Weise untermaximal gereizten Ganglion durch das antigene Serum bei einer völligen Unwirksamkeit am ungereizten Ganglion war zunächst befremdend und in seinem neurophysiologischen Mechanismus nur schwer zu erklären. Wir führten schließlich spezielle vergleichende Untersuchungen mit kleinen Dosen von Nicotin, Histamin und Serotonin durch. Dabei ergab sich für das Nicotin, daß kleinste Dosen (5 γ), die am unerregten Ganglion keine Reaktion auslösen konnten, den Reizerfolg des untermaximal erregten Ganglions steigerten. Intraarterielle Injektionen kleiner Dosen von Histamin erregten das ungereizte Ganglion und verstärkten den Reizerfolg des untermaximal gereizten Ganglions. Kleinste Dosen von Serotonin (0,5 bis 5,0 γ), die am unerregten Ganglion noch unwirksam waren, bewirkten

bereits eine Verstärkung des Reizerfolges am untermaximal gereizten Ganglion.

Ausreichende Mengen eines Antihistaminicums (Neo-Bridal 250 γ/kg i.v.) konnten die Wirkung des als Antigen verwendeten Serums, getestet am Blutdruck, nicht aufheben.

Diskussion

Als Kriterium für eine echte anaphylaktische Organreaktion des von uns untersuchten Ganglions müßten folgende Forderungen erhoben werden: Die Reaktion, gleich ob sie sich in einer Erregung oder Lähmung der Ganglienzellen äußerte, müßte von einer gewissen Schwellendosis des Antigens ab auslösbar sein; es dürfte dann aber keine wesentliche Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit mehr bestehen. Außerdem müßte die spezifische Reaktion über einen kurzfristigen Kontakt mit dem Antigen hinaus wirksam sein. Die Forderung einer akuten Desensibilisierung ist auf unsere Versuchsanordnung nicht uneingeschränkt anwendbar, weil wir nicht entscheiden können, ob die jeweils erstmals zugeführte Antigendosis bei ihrem schnellen Abtransport auf dem Blutwege ausreichte, um die ortsständigen Antikörper völlig abzusättigen.

Ziehen wir diese allgemeinen Forderungen bei der Deutung unserer Befunde in Betracht, so *können wir auch bei den sicher sensibilisierten Tieren nicht annehmen, daß es sich* bei den beobachteten Erscheinungen *um echte anaphylaktische Reaktionen der Ganglienzellen* selbst *gehandelt hat*. Dies um so mehr, als wir am unerregten Ganglion niemals Wirkungen des Antigens gesehen haben.

Daraus ergibt sich die Frage, auf welche andere Weise die beobachteten Reaktionen zustande kamen. Eine primäre Wirkung des Antigens an der Gefäßmuskulatur ist nicht anzunehmen, da eine solche zu einer Drosselung der Durchblutung des Ganglions geführt haben würde, aus der letztlich keine Förderung des Reizerfolges resultieren könnte. Übrigbleibt eine pharmakologische Wirkung von Stoffen, die entweder in den Seren präformiert waren oder durch die Wirkung der Seren im Blut des Tieres freigesetzt wurden. Ein Stoff, der im Serum präformiert ist, wenn auch bei verschiedenen Species in unterschiedlicher Menge (Humphrey u. Jaques, 1954), ist Serotonin. Dies ist nach eigenen Beobachtungen, die wir bei Trendelenburg (1956) bestätigt fanden, in kleinsten Konzentrationen in der Lage, einen Reizerfolg von untermaximalen Reizen zu potenzieren. Andererseits ist aus der Arbeit von Feldberg u. Schachter bekannt, daß bei normalen Katzen eine Injektion von artfremdem Serum eine Freisetzung von Histamin bewirkt, wie sie sonst nur bei gegen dieses Serum sensibilisierten Tieren beobachtet wird. Auch für das Histamin gibt Trendelenburg (1954 u. 1955) an, daß es eine Potenzierung von

untermaximalen Reizen bewirkt, was wir durch eigene Untersuchungen bestätigt fanden.

Das von Brodie 1911 zuerst beschriebene Verhalten von Katzen, das eine Injektion von artfremdem Serum auslösen kann, ist wahrscheinlich teilweise eine Wirkung des dabei freigesetzten Histamins. Daneben ist wohl an eine Serotoninfreisetzung zu denken, da sich die Brodie-Reaktion durch Vorgabe eines Antihistaminicums nur wenig beeinflussen ließ.

Die Wirkung von intraarteriellen Seruminjektionen, wie wir sie bei sensibilisierten Tieren sahen, kam in der Regel mit solch geringen Mengen zustande, wie sie bei Kontrolltieren ohne Wirkung geblieben waren. Nach Humphrey u. Jaques wird im anaphylaktischen Schock aus den dabei zerfallenden Thrombocyten neben Histamin Serotonin freigesetzt. Berücksichtigt man die quantitativen Angaben der hierzu vorliegenden Literatur (Humphrey u. Jaques, 1953 u. 1954; Zucker, Friedmann u. Rapport), so handelt es sich dabei um Mengen, die durchaus für die beobachteten Wirkungen verantwortlich gemacht werden können. Auch Reid kommt bei seiner Interpretation der Arbeit von Bender zu dem Schluß, daß im anaphylaktischen Schock Serotonin freigesetzt wird, da die denervierte Iris nur durch Indolalkylamine (z. B. Serotonin) oder im anaphylaktischen Schock, nicht aber durch Histamin, zur Kontraktion gebracht werden kann.

Die Wirksamkeit der geringen Mengen antigenen Serums am Ganglion ist somit wahrscheinlich Ausdruck einer Antigen-Antikörper-Reaktion im Blut, die zu einer gesteigerten Freisetzung von Histamin und Serotonin führt. Die Eigenwirkung der antigenen Seren und ihre spezifische Wirksamkeit an gegen sie sensibilisierten Katzen unterscheiden sich demnach nur quantitativ und nicht qualitativ in ihrem Wirkungsmechanismus.

Summary

Cats were sensitized by repeated injections of dogs serum or sheep serum. Intraarterial injections of the antigen by way of the A. occipitalis into the ganglion cervicale craniale caused an increased response of the nictitating membrane to the preganglionic submaximal stimulation. This effect of the antigen serum was observed in sensitized cats by so small doses as to remain ineffective in normal cats. These effects were transient and limited for the length of intraarterial injection. Their interpretation as histamine- or serotonine-action is discussed. There is no evidence of the ganglion itself reacting as an organ in a truly anaphylactic sense.

Literatur

Ajo, C.: Recherches sur le rôle du système nerveux dans la production du phénomène d'Arthus. C. r. Soc. Biol. (Paris) **120**, 1177 (1935). — Ajo, C., et A. Arthus: Recherches sur le rôle des nerfs sympatiques dans la production du phénomène

d'Arthus. C. r. Soc. (Paris) **124**, 1045 (1937). — Arnoldi, W., u. E. Leschke: Die sessilen Rezeptoren bei der Anaphylaxie und die Rolle des autonomen Nervensystems beim anaphylaktischen Symptomenkomplex. Dtsch. med. Wschr. **1920**, 1018. — Baschenin, W. A.: Über den Mechanismus der Sensibilisierung. Z. Immun.forsch. **54**, 226—236 (1927/28). — Belák, S.: Schutzstoffbildung als vegetative Funktion. Klin. Wschr. **1939**, 472. — Sympathergische (adrenergische) und parasympathergische (cholinergische) Immunität. Z. Immun.forsch. **100**, 264—292 (1941). — Bender, M. B.: The Reaction of the Smooth-Muscle of the Denervated Iris in Anaphylaxis. J. of Immun. **47**, 483 (1943). — Biedl, A., u. R. Kraus: Die experimentelle Analyse der anaphylaktischen Vergiftung, in: Kraus u. Levaditi, Handb. d. Technik u. Methodik d. Immun.Fschg. 1. Erg.Bd., S. 255 (1911). — Bogendörfer, L.: Über den Einfluß des Zentralnervensystems auf Immunitätsvorgänge. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **124**, 65 (1927). — Brandon, A.: Electrocorticographic and Electromyelographic Findings in Anaphylactic Shock. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. **7**, 371—374 (1955). — Brodie, T. G.: The immediate action of an intravenous injection of blood-serum. J. of Physiol. **26**, 48 (1900/01). — Cervoni, P., T. C. West and L. D. Fink: Autonomic postganglionic innervation of the nictitating membrane of the cat. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **116**, 90—97 (1956). — Chauchard, B., et P. Chauchard: Réactions anaphylactiques du système erveux végétatif. C. r. Soc. Biol. (Paris) **146**,2 1723-1725 (1952). — Chungcharoen, D., M. de Burgh Daly and A. Schweitzer: The blood supply of the superior cervical sympathetic and the nodose ganglia in cats, dogs and rabbits. J. of Physiol. **118**, 528—536 (1952). — Davis, D. D., and H. E. Story: Carotid circulation in the dom. cat. Field Museum of Natural History Publ. (Zool. Series) **28**, 5—47 (1943/44). — Doerr, R.: Die Anaphylaxieforschung im Zeitraume von 1914—1921. Erg. Hyg. **5**, 73 (1922). — Drinker, C. K., and J. Bronfenbrenner: The pulmonary circulation in anaphylactic shock. J. of Immunl. **9**, 387—406 (1924). — Ederle, W.: Allergie und Nervensystem. Stuttgart 1947. — Edmunds, Ch. W.: Physiological studies in anaphylaxis. Z. Immun.forsch. **22**, 181—198 (1914). — Enenkel, H. J., u. H. W. Pedal: Vegetatives Nervensystem und Immunität. I. Über den Einfluß des vegetativen Nervensystems auf die Bildung des Diphtherie-Antitoxins beim Kaninchen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 69—77 (1955). — Engelhardt, G., u. L. Lendle: Serumanaphylaktische Reaktionen am nervenfreien Hühneramnion. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 402—420 (1955). — Fagraeus, A.: Plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. Nature (Lond.) **4041**, 499 (1947). — Fagraeus, A.: The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. J. of Immun. **58**, 113 (1948). — Feldberg, W., and M. Schachter: Histamine release by horse serum from skin of the sensitized dog and non-sensitized cat. J. of Physiol. **118**, 124—134 (1952). — Folkow, Björn: Impulse frequency in sympathetic vasomotor fibres correlated to the release and elimination of the transmitter. Acta physiol. scand. (Stockh.) **25**, 49—76 (1952). — Gäumann, E., R. Braun und G. Bazzigher: Über induzierte Abwehrreaktionen bei Orchideen. Phytopathologische Z. **17**, 36—62 (1951). — Göing, H., u. U. Hackenberg: Zur Frage der Sensibilisierung des Herzvagus bei der anaphylaktischen Reaktion. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 259—264 (1955). — Gomirato, G. Modificazioni dell'attività elettrica corticale nello shock anafilattico sperimentale nel coniglio. Sistema nerv. (Milano) **2**, 125—126 (1950). — Goreczky, L., u. G. Klinkhart: Über den Zusammenhang zwischen dem vegetativen Nervensystem und der Antitoxinbildung bei Kaninchen. Z. Immun.forsch. **101**, 428—437 (1942). — Heim, F.: Allergie und vegetatives Nervensystem. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **196**, 51 (1940). — Humphrey, J. H., and R. Jaques: Liberation of histamine and serotonine from

platelets by antigen-antibody reactions in vitro. J. of Physiol. **119**, 43 P (1953). The histamine and serotonine content of the platelets and polymorphonuclear leucocytes of various species. J. of Physiol. **124**, 305—310 (1954). — Jensen, J., u. H. Woratz: Immunitätsvorgänge im bebrüteten Hühnerei. (Ein Beitrag zur Chloromycetinwirkung.) Arch. f. Hyg. **136**, 343—353 (1952). — Kalbfleisch, H. H.: Über experimentelle Allergie. Dtsch. med. Wschr. **1938**, 1601. — Allergie als relationspathologisches Problem. Ärztl. Forsch. **2**, 169—175 (1948). — Kallos, P., u. L. Kallos-Deffner: Betrachtungen über einige aktuelle Allergieprobleme. Internat. Arch. Allergy a. Applied Immunology **2**, 198 (1951). — Kibjakow, A. W.: Über humorale Übertragung der Erregung von einem Neuron auf das andere. Pflügers Arch. **232**, 432—443 (1933). — Kübler, W.: 5-Hydroxytryptamin. Dtsch. med. Wschr. **1953**, 1447—1448. — Lissák, K., and B. R. Hodes: The sympathic nervous system and anaphylactic Shock. Amer. J. Physiol. **124**, 637 (1938). — Manwaring, W. H.: Serophysiologische Untersuchungen. I. Der physiologische Mechanismus des anaphylaktischen Schocks. Z. Immun.forsch. **7**, 1 (1911). — Masuda, T.: Über die Antikörperbildung unter Anwendung der Gewebezüchtung. Arch. exper. Zellforsch. **15**, 446—451 (1934). — Meyer, K., u. H. Loewenthal: Untersuchungen über Antikörperbildung in Gewebekulturen. Z. Immun.forsch. **54**, 409—419 (1927/28). — Mikulicich, G., and Y. T. Oester: Relation of Anaphylactic Reaction to Neurogenic Factors. Amer. J. Physiol. **171**, 592—599 (1952). — Pedal, H. W., u. H. J. Enenkel: Über den Einfluß von Ephedrin, Pilocarpin und Megaphen auf die Bildung des Diphtherie-Antitoxins beim Kaninchen. (Vegetatives Nervensystem und Immunität.) II. Mitteilung Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 142—148 (1955). — Reid, G.: Circulatory effects of 5-hydroxytryptamine. J. of Physiol. **118**, 435—453 (1952). — Reitler, R.: Zur Kenntnis der Immunkörperbildung im Organismus. Z. Immun.forschg. **40**, 443 (1924). — Sato, T.: Über Präzipitine. Jap. Z. f. Mikrobiol. u. Pathol. **24**, 1 (1930). — Schürer, J., u. R. Strasmann: Zur Physiologie des anaphylaktischen Schocks. Z. Immun.forschg. **12**, 143 (1912). — Seastone, C. V., and A. Rosenblueth: The role of the autonomic nervous system in the anaphylactic smooth muscle contraction. J. of Immun. **27**, 57—61 (1934). — Seelich, F., u. K. Niessing: Zur Frage der anaphylaktischen Zellveränderungen. Z. Immun.forschg. **98**, 1 (1940). — Seelich, F.: Die physikalisch-chemischen Vorgänge bei der Antigen-Antikörperreaktion und deren Beziehungen zu den anaphylaktischen Erscheinungen. Wien. klin. Wschr. **1948**, 709. — Seelich, F., u. L. Stockinger: Die zytotoxische Wirkung spezifischer Antikörper auf Gewebekulturen. Z. Immun.forschg **111**, 1 (1954). — Spiegel, E. A., u. K. Kubo: Anaphylaxie und Nervensystem. Z. exper. Med. **38**, 458 (1923). — Stickl, H., u. A. Kerstien: Das Verhalten von Antigenen im Organismus und die vegetative Tonuslage. Klin. Wschr. **1955**, 479—482. — Stief, A., u. L. Tokay: Durch experimentelle Serumanaphylaxie verursachte Veränderungen des Nervensystems. Z. Neur. **150**, 715—728 (1934). — Trendelenburg, G. The action of histamine and pilocarpine on the superior cervical ganglion and the adrenalglands of the cat. Brit. J. Pharmacol. **9**, 181—187 (1954). — Die Wirkung von Histamin und Pilocarpin auf sympathische Ganglien und Nebennieren. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 106—107 (1955). — The potentiation of ganglionic transmission by histamine and pilocarpine. J. of Physiol. **129**, 337—351 (1955). — The action of 5-hydroxytryptamine on the nictitating membrane and on the superior cervical ganglion of the cat. Brit. J. Pharmacol. **11**, 74—80 (1956). — Tusch, E., u. H. Moser: Zur Frage der Abhängigkeit der Antikörperbildung und des anaphylaktischen Schocks vom Zentralnervensystem. Z. Immun.forschg. **108**, 89—98 (1951). — Uhlenhuth, P., u. K. Steffenhagen: Die biologische Eiweiß-Differenzierung mit Hilfe der Präzipitinreaktion. In: W. Kolle, A. v. Wassermann: Handb. d.

pathogenen Mikroorganismen, 2. Aufl., Bd. 3, S. 295—297. Berlin: Springer 1913. — Went, S., u. K. Lissák: Einfluß totaler Sympathektomie auf die antibakteriellen Eigenschaften der Sera. Z. Immun.forschg. **99**, 215—221 (1941). — Went, St.: Vegetatives Nervensystem und Immunität. Z. Immun.forschg. **101**, 161-167 (1942). — Wilde, H.: Zur Frage der Abhängigkeit der Antigen-Antikörperreaktion von der Gegenwart nervalen Gewebes. Die Medizinische **1952**, 1 S. 733—734. — Wittich, F. W.: Active anaphylaxis in the chick embryo. J. Allergy **12**, 523 (1941). — Zucker, M. B., B. K. Friedmann and M. M. Rapport: Identification and quantitative determination of serotonine (5-hydroxytryptamine) in blood platelets. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **85**, 282—285 (1954).

Dr. G. Engelhardt, Pharmakologisches Institut der Universität, Göttingen

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 107—124 (1957)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg/Brg.
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. L. Heilmeyer)

Zur Funktion des Ferritins bei der Eisenresorption

Von
F. Wöhler, L. Heilmeyer, D. Emrich und Shin Ho Kang

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Oktober 1956)

Von Hahn u. Mitarb. wurde auf Grund ihrer Untersuchungen über die Eisenresorption bei gesunden und anämischen Hunden erstmals ein sogenannter „mucosal acceptor" für Eisen in der Darmwand angenommen, der nach Absättigung zum „mucosal block" würde. Sie vermuteten, daß bei diesem Vorgang dem Ferritin eine besondere Rolle zukommen könnte.

In tierexperimentellen Studien am Meerschweinchen gelang es dann Granick mittels der semiquantitativen Methode der Auszählung von Ferritinkristallen in der Mucosa des Magens, Dünndarmes und Dickdarmes eine Zunahme der Zahl der Ferritinkristalle bei Eisenfütterung nachzuweisen, die nach 7 Std etwa ihr Maximum erreichte und bei weiterer oraler Eisenzufuhr während 10 Tagen nicht abnahm. Wurde die Eisenzufuhr abgesetzt, so trat ein langsames Zurückgehen der Zahl der Ferritinkristalle ein. Da er mit der angewandten Methode beim normalen Meerschweinchen nur äußerst wenig Ferritinkristalle sah, glaubte er annehmen zu können, daß bei einem geringen Eisenangebot die Ferro-Ionen die Mucosazelle passieren, um dann an das Transferrin gebunden zu werden. Erst bei einem stärkeren Eisenangebot sollte vermehrt Apoferritin in der Mucosazelle gebildet werden. Granick nahm weiterhin an, daß bei starkem Eisenangebot die Mucosazelle sich mit Ferritin fülle und dadurch eine weitere Resorption verhindert werde. Erst wenn kein weiteres Eisen angeboten würde, käme es zur langsamen Abgabe an den Organismus.

Diese Art der Regulation der Eisenaufnahme schien sehr einleuchtend, konnten doch schon Heilmeyer u. Plötner, Heilmeyer u. Koch, sowie Lintzel u. a. in Resorptionsversuchen zeigen, daß die Eisenresorption vom Bedarf des Organismus abhängig ist und eine Überflutung mit Eisen selbst bei Verabreichung höchster Dosen nicht eintritt.

Bei Untersuchungen des Ferritingehaltes des Magen-Darmtraktes bei an Hämochromatose Verstorbenen und anderen Patienten (Heilmeyer u. Wöhler) wie auch unter verschiedenen experimentellen Bedingungen an Meerschweinchen (Wöhler u. Emrich) erhielten wir Ergebnisse, die sich nicht ohne weiteres mit der Vorstellung eines Mucosablockes im Sinne von Granick vereinbaren ließen.

Es sollte daher versucht werden, durch die Anwendung einer quantitativ exakten Ferritinbestimmung (Keiderling u. Wöhler) im Tierexperiment die Frage der Funktion des Ferritins bei der Eisenresorption weiter zu klären.

Zu untersuchen war das Verhalten des Ferritins im Magen- und Darmtrakt nach einmaliger oraler Eisenzufuhr bei gleichzeitiger Prüfung des Ferritin- und Hämosiderineisengehaltes der Leber. Dann sollte der

Ferritineisengehalt von Magen und Darm und ergänzend der Ferritin- und Hämosiderineisengehalt von Leber, Milz und Niere nach 3-, 6-, 10-, 14-, 21- und 28tägiger oraler Eisenzufuhr geprüft werden. Weiter interessierten eventuelle Veränderungen des Ferritineisengehaltes bei Blutungsanämien mit und ohne Eisengabe. Außerdem lag es nahe, die Frage der Eisenresorption durch den Magen auf Grund des Ferritineisengehaltes des Magens und der Speichereisenfraktionen der Leber zu klären.

Auch die Möglichkeit einer Beeinflussung der Eisenresorption und der Speichereisenfraktionen von Leber, Milz und Niere durch stark reduzierend wirkende Substanzen wie Ascorbinsäure und Cystein sollten untersucht werden, zumal wir schon früher die Ansicht vertreten haben, daß dem aktivierten Sulfhydrilsystem bei Infektionen für die erstmals von Heilmeyer dabei beobachteten Veränderungen im Eisenstoffwechsel ursächlich große Bedeutung zukommen könnte (Wöhler).

Endlich interessierte das Verhalten des Ferritins und Hämosiderins in den Organen, besonders aber im Magen-Darmtrakt bei maximaler, intramuskulär herbeigeführter Eisenüberflutung.

I. Material und Methoden

Zur Untersuchung verwendeten wir 120 Meerschweinchen aus einem gesunden Inzuchtstamm mit einem Durchschnittsgewicht von 400 g. Es wurde besonders darauf geachtet, daß die Tiere etwa gleich alt waren, da Vorversuche zeigten, daß der Eisengehalt der Organe stark vom Alter der Tiere abhängig ist. Die Versuchstiere erhielten eine einheitliche Ernährung aus Grünfutter und Körnern.

Ferrum sulfuricum siccatum (DAB 6) wurde in der Dosis von 100 mg, entsprechend etwa 33 mg Fe-(II)-Ionen/kg Körpergewicht den Versuchsgruppen einmalig, bzw. 3-, 6-, 10-, 14-, 21- und 28tägig durch die Schlundsonde verabreicht. Zur intramuskulären Eiseninjektion gelangte Imferon, eine Dextran-Eisenkomplexverbindung in der Dosis von 200 mg pro Tier.

Cystein (Hormodyn Fa. Nordmarck) wurde 10tägig in der Konzentration von 200 mg/kg i. p. verabreicht.

Ascorbinsäure (Fa. Merck) kam in der einmaligen Dosis von 2 g/kg oral zur Anwendung.

Die Verabfolgung von Kobalt-(II)-Chlorid wurde nach Lösung in aqua bidest. intramuskulär vorgenommen, wobei die Tiere 3,0 bzw. 6,0 mg Kobalt-(II)-Ionen/kg täglich für die entsprechende Versuchsdauer erhielten.

Die quantitative Ferritineisenbestimmung erfolgte in einer Modifikation der früher von Keiderling u. Wöhler angegebenen Methode in der Weise, daß nach Homogenisierung des Organgewebes das Homogenat 2 Std bei Zimmertemperatur stehen blieb und dann sehr langsam bis 80° C im Wasserbad erwärmt wurde, wobei die Masse der Proteine ausfiel. Nach Abkühlung Zentrifugation 20 min bei 3000 U/min. Anschließend Filtration (Filter Schl. & Sch. 589[3]) des Überstandes. Der abzentrifugierte Zellbrei bzw. die denaturierten und ausgefallenen Zelleiweißkörper wurden verworfen. Im Exsiccator über H_2SO_4 Einengung des Filtrats bis zur Trockne. Ausgehend von der ursprünglich homogenisierten Gewebsmenge erfolgte die Lösung des erhaltenen Rückstandes in 0,5 –1,0 cm^3 aqua bidest. Hiervon trug man Mengen von 0,02 cm^3 für die Leber bis 0,1 cm^3 für das Duodenum zur

elektrophoretischen Trennung auf. Zur Elektrophorese wurde Whatman-Papier Nr. 1, das relativ eisenfrei ist, verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 110 bis 120 Volt und einer Stromstärke von 3 Milliamp. pro Streifen mit der Elektrophoreseapparatur der Fa. Bender & Hobein, München. Als Pufferlösung diente der übliche Veronal-Natrium-Puffer vom p_H 8,6. Nach 14 –16 Std Laufzeit trocknete man die Elektrophoresestreifen bei 100° C. Anschließend wurden die Streifen waagerecht auf einen Kunststoffrahmen aufgespannt und mit einer 6 n HCl-Lösung, die aus 11 n HCl p. A. und eisenfreiem aqua bidest. hergestellt worden war, besprüht. Die verwendeten Glasgeräte waren mit den üblichen Methoden eisenfrei gemacht worden. Nachdem die Streifen mit der HCl-Lösung von beiden Seiten besprüht und gut durchfeuchtet waren, wurden sie wiederum bei 100° C getrocknet und abermals mit einer 2%igen frisch mit eisenfreiem aqua bidest. hergestellten Kalium-Ferrocyanidlösung besprüht. Nach Trocknung bei 100° C erfolgte ganz leichtes beidseitiges Besprühen mit der 6 n HCl-Lösung. Anschließend Lufttrocknung. Danach wurden die Elektrophoresestreifen etwa 2—3 min in eisenfreiem H_2O gewässert, um die überschüssige Salzsäure und die Kalium-Ferrocyanidlösung vom Streifen zu entfernen. Nach Lufttrocknung kann der Streifen nach Transparentmachung in der üblichen Transparenzflüssigkeit (α-Bromnaphthalein und Paraffinöl 1 : 2) im Elphorgerät von Bender & Hobein photometrisch ausgewertet werden. Der für die blaue Eisenbande schließlich ermittelte Planimeterwert gibt an Hand einer Eichkurve, wie wir sie früher beschrieben (Keiderling u. Wöhler) den Eisenwert in Gamma wieder. Durch entsprechende Umrechnungen für die aufgetragene Menge bzw. homogenisiertes Organgewebe kann dann letztlich der Ferritineisengehalt absolut oder in mg pro 100 g Organgewebe angegeben werden. Diese Modifikation der Ferritinbestimmungsmethode wurde gewählt, um bei dem teilweise doch sehr geringen Ausgangsmaterial, wie es z. B. bei dem Duodenum der Fall ist, eine exakte Ferritineisenbestimmung zu ermöglichen. Eine genaue Apoferritinbestimmung ist allerdings bei dieser Art der Aufarbeitung nicht mehr möglich, da die noch reichlich vorhandenen anderen Zellproteine das Apoferritin im Elektrophoresestreifen überlagern. Da für die vorgesehenen Eisenstoffwechseluntersuchungen der Ferritineisengehalt jedoch von besonderer Bedeutung war, konnte eine Vernachlässigung der Apoferritinbestimmung in Kauf genommen werden, zumal der Ferritineisengehalt keinen größeren Schwankungen unterliegt, so daß bei einem Durchschnittseisengehalt von etwa 23% des Ferritins gute Rückschlüsse auf den eigentlichen Ferritingehalt der untersuchten Organe möglich sind.

Die Bestimmung des gesamten Organeisens erfolgte nach feuchter Veraschung (H. Neumann) quantitativ chemisch nach L. Heilmeyer u. K. Plötner.

Der Hämosiderineisengehalt der Organe wurde durch Subtraktion des Ferritineisens und des Hämoglobineisens bei Vernachlässigung der Fermenteisenfraktion erhalten. Die Ermittlung des Hämoglobineisens erreichte man indirekt durch elektrophoretische Abtrennung des Hämoglobins von den Zellproteinen der jeweiligen Organe und rechnerischer Bestimmung des Eisenanteils im Hämoglobin nach einer noch unveröffentlichten Methode von Wöhler.

Die histochemische Eisendarstellung in den Geweben erfolgte einmal vermittels der Turnbullblau-Reaktion nach Tiermann u. Schmeltzer in der Modifikation von Hueck. Außerdem wandten wir eine von de Vinals angegebene und von Wöhler wie folgt modifizierte histochemische Eisendarstellung an.

Entparaffinierte Schnitte auf dem Objektträger wurden in eine mit eisenfreiem aqua bidest. frisch hergestellte 3%ige Kalium-Ferrocyanidlösung eingebracht. Pro cm^3 Lösung dann ein Tropfen einer 37%igen HCl p. A. unter leichtem Schwenken der Petri-Schale hinzugefügt, anschließend erfolgte langsames Erhitzen über der Flamme bis 30° C, dann wurden pro 10 cm^3 der Ausgangslösung zwei weitere

Tropfen 37%iger HCl hinzugegeben, nach schnellem Erhitzen bis auf 55° C nahm man die Objektträger aus dieser Lösung heraus, um sie im eisenfreien aqua bidest. zu wässern. Es erscheint notwendig, darauf hinzuweisen, daß die Schnitte sehr schnell aus dieser HCl-Kalium-Ferrocyanidlösung entfernt werden, da durch die konzentrierte HCl aus dem Kalium-Ferrocyanid schon allein die sog. Eisenblausäure und

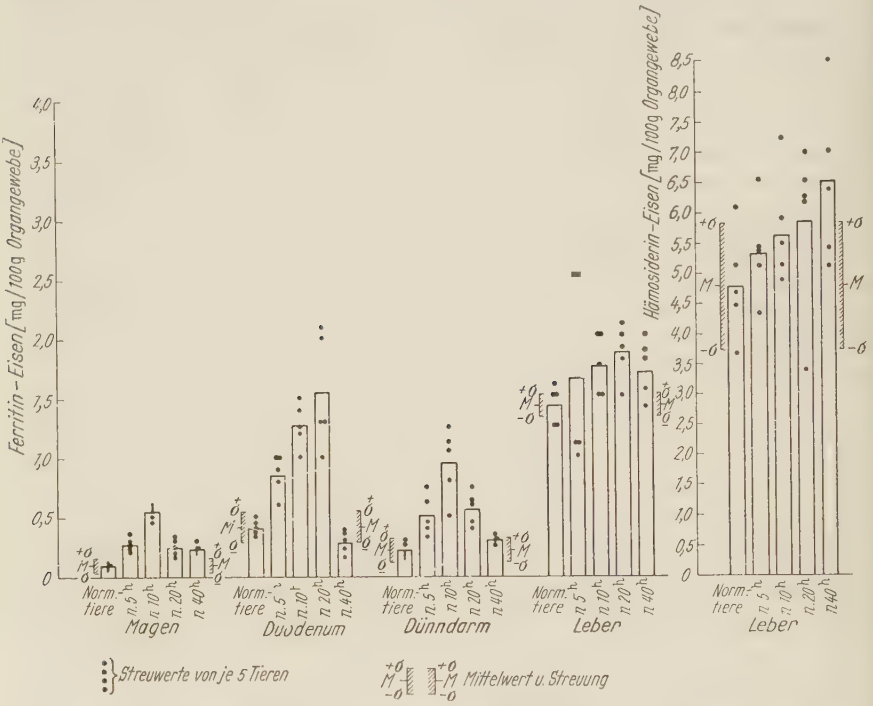


Abb. 1. Ferritineisengehalt von Magen, Duodenum, Dünndarm und Leber, Hämosiderineisengehalt der Leber, 5, 10, 20 und 40 Std nach einmaliger Gabe von Fe^{++} 15 mg

unter Einwirkung des Luftsauerstoffs Berlinerblau entstehen kann. Ein solcher Niederschlag kann dann im Präparat zu Täuschungen Anlaß geben. Für jede histochemische Eisenreaktion muß daher die HCl-Kalium-Ferrocyanidlösung neu bereitet werden. Die Gegenfärbung nahmen wir mit Carminalaun vor.

II. Ergebnisse

Normaltiere. Um vergleichbare Ausgangswerte zu erhalten, wurde von 5 Meerschweinchen der Ferritin- und Hämosiderineisengehalt von Magen, Duodenum, Dünndarm, Leber, Milz und Niere bestimmt. Wir waren uns dabei bewußt, daß der Gesamteisen- und damit der Hämosiderineisengehalt von Magen, Duodenum und Dünndarm sicher zu hoch ausfiel, da trotz sorgfältigster Spülung Schleimreste aus den Drüsenschläuchen des Magens oder den Schleimhautfalten des Darmes nicht zu entfernen waren, was sich auch bei der histologischen Kontrolle bestätigte.

Die erhaltenen Werte des Ferritin- und Hämosiderineisens wurden statistisch gesichert.

Ergebnisse bei oraler Eisenzufuhr. Bei einmaliger Gabe von Fe 15 mg kam es, wie Abb. 1 zeigt, zu einem vorübergehenden Anstieg der Ferritineisenfraktionen von Magen, Duodenum und Dünndarm, der im

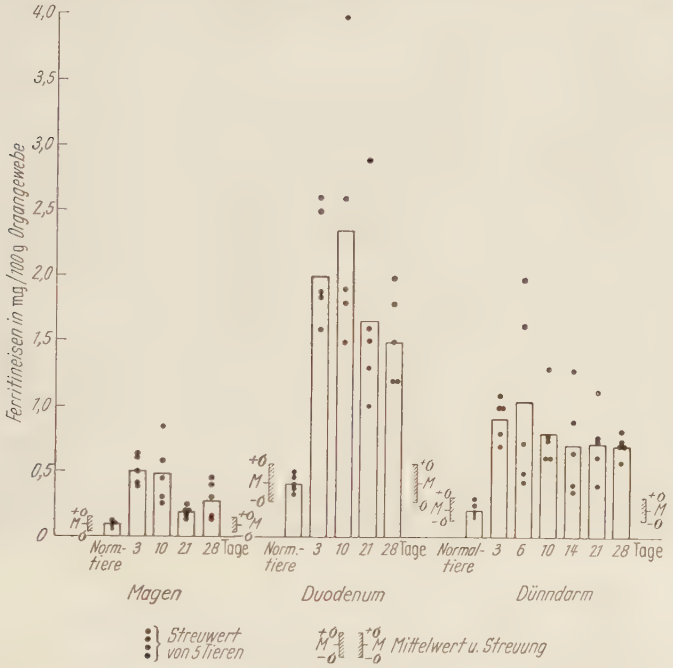


Abb. 2a. Ferritineisengehalt von Magen, Duodenum und Dünndarm 3, 6, 10, 14, 21 und 28 Tage nach täglicher Verabreichung von Fe^{++} 15 mg

Duodenum die höchsten Werte erreichte. Parallel zu diesem Anstieg ließ sich eine Zunahme des Ferritin- und Hämosiderineisens in der Leber als Ausdruck der verstärkten Eisenresorption nachweisen. Dieser Befund entsprach den Untersuchungen von Schäfer u. Breyer, wonach die Leber als primäres Aufnahmeorgan für über den Darm zugeführtes Eisen gelten muß.

40 Std nach der Eisenverabreichung waren im Magen-Darmtrakt etwa die beim Normaltier gefundenen Werte wieder erreicht. Ähnlich den Beobachtungen von Granick fanden wir nach 10 Std für Magen und Dünndarm und nach 20 Std für das Duodenum die höchsten Werte.

Es war also in Abhängigkeit von der Zeit nach der Eisenverabreichung zu einem Anstieg und Absinken des Ferritineisengehaltes im Magen- und Darmtrakt gekommen; wie die Speichereisenfraktionen der Leber zeigten, hat zeitlich gleichlaufend eine Eisenresorption stattgefunden.

Histochemisch war bei den Normaltieren und bis 20 Std nach der Eisengabe im Magen, Duodenum und Dünndarm intracellulär nicht sicher Eisen nachzuweisen. Erst zu der genannten Zeit und nach 40 Std waren ganz vereinzelt in der lamina propria einiger Zotten des Dünndarms geringfügige Eisenablagerungen aufzufinden.

Bei täglicher oraler Eisengabe von Fe 15 mg bis zu einer Dauer von 28 Tagen, deren Ergebnisse in Abb. 2a und 2b dargestellt werden, trat im Magen- und Darmtrakt des Meerschweinchens etwa bis zum 10. Tage

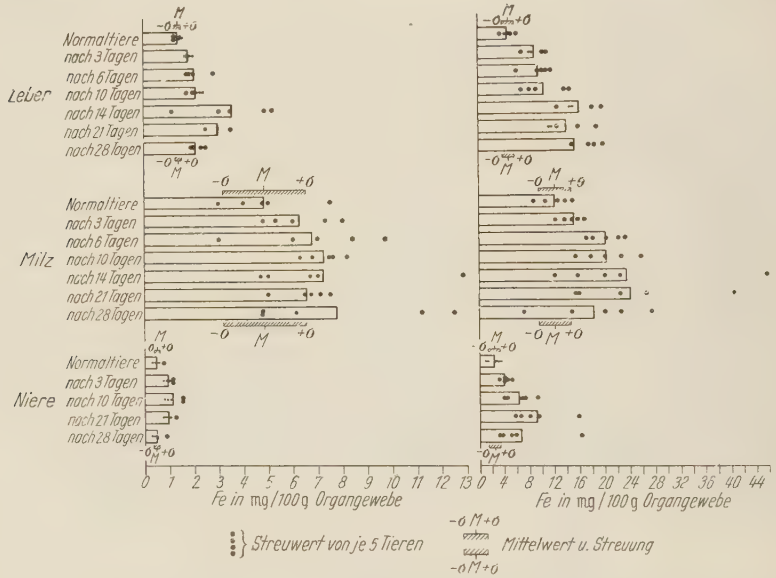


Abb. 2b. Ferritineisen und Hämosiderineisengehalt von Leber, Milz und Niere des Meerschweinchen nach 3, 6, 10, 14, 21 und 28 Tagen bei täglicher Gabe von Fe^{++} 15 mg

ein Anwachsen des Ferritineisengehaltes ein. Am auffälligsten war diese Vermehrung im Duodenum. Nach dieser Zeit wurde der Ferritineisengehalt erniedrigt gefunden, wobei die Werte ein gewisses Gleichbleiben erkennen lassen, wie es vor allem im Dünndarm zum Ausdruck kommt. Gegenüber den Normalwerten sind diese späteren Tagewerte noch immer erhöht.

Die Ergebnisse über den Ferritin- und Hämosiderineisengehalt von Leber und Milz, weniger ausgeprägt der Niere, lassen erkennen, daß etwa vom 14. Tage ab kein weiterer Eisenzuwachs in den Organen stattfand. Es scheint also, daß bis zu diesem Zeitpunkt eine Absättigung des Organismus eingetreten war. Parallel zu dieser Absättigung wurde das Absinken des Ferritineisengehaltes von Magen, Duodenum und Dünndarm beobachtet, wobei der Ferritineisenspiegel etwa bis zum 28. Tage jedoch nur geringe Schwankungen aufwies.

Histochemisch waren mit der modifizierten Methode nach DE VINALS etwa verstärkt vom 10. Tage an in den Dünndarmzotten im Protoplasma der dem Darmlumen zunächst liegenden Mucosazellen feinstkörnige

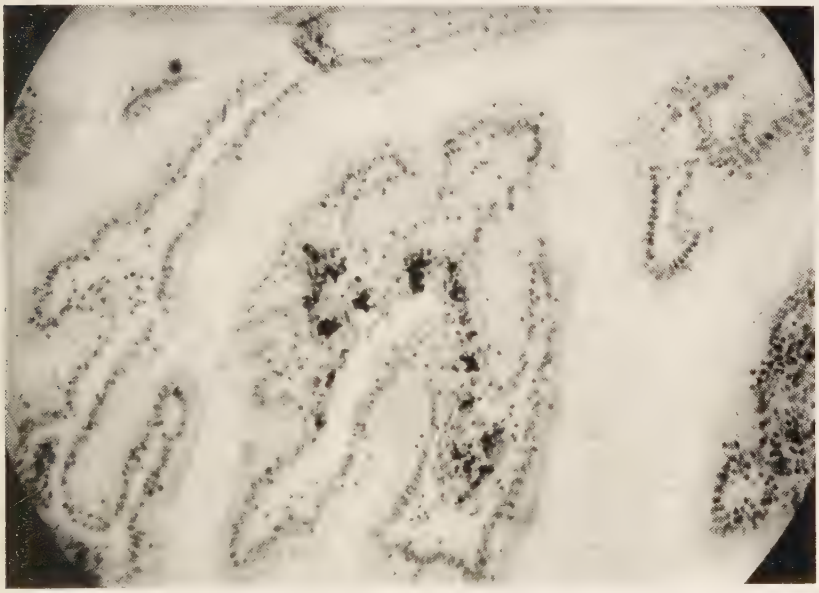


Abb. 3a

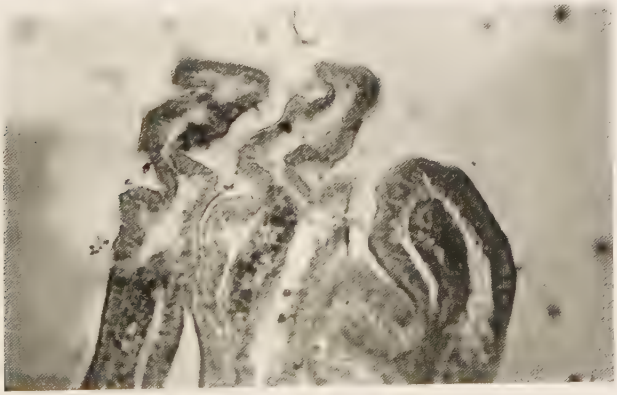


Abb. 3b

Abb. 3a u. b. Eisenspeicherung im Interstitium von Dünndarmzotten. a Querschnitt; b Längsschnitt

Eisenablagerungen nachweisbar. Überraschend war jedoch die regelmäßig auffindbare Eisenspeicherung im Interstitium bzw. der lamina propria, wie sie auch von GRANICK und von DE VINALS u. Mitarb. beschrieben wurde. Es bestand ein sicherer Zusammenhang zwischen der

Zunahme des histochemisch nachweisbaren Eisens und der Zeitdauer seiner Verabreichung. Von einer Bestimmung des Hämosiderineisengehaltes vom Magen- und Darmtrakt haben wir Abstand nehmen müssen, da sich zeigte, daß der Eisengehalt durch Schleimretention mit Eisen in

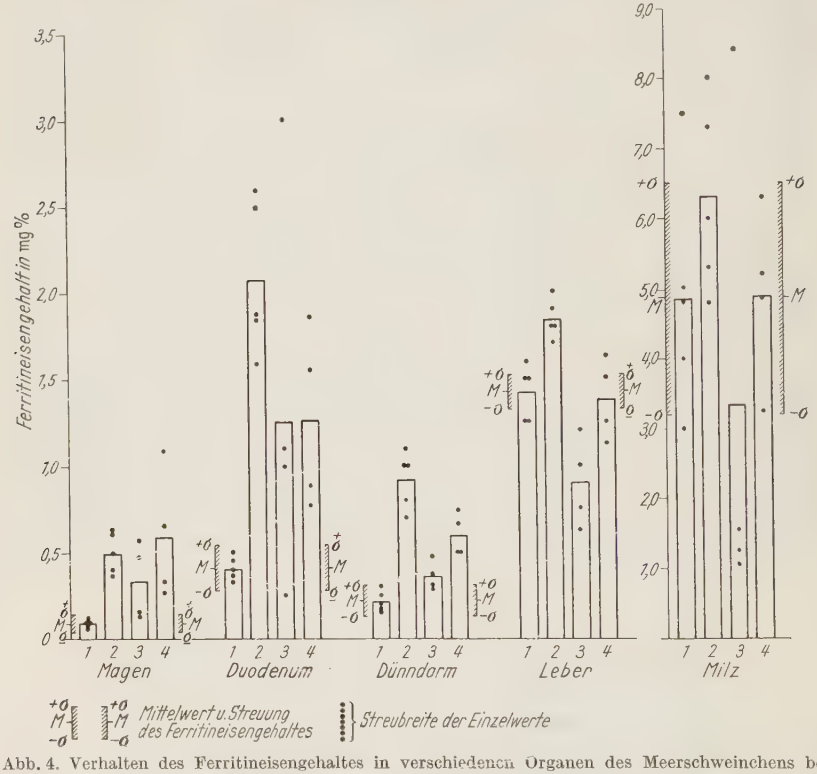


Abb. 4. Verhalten des Ferritineisengehaltes in verschiedenen Organen des Meerschweinchens bei experimenteller Blutungsanämie ohne und mit oraler Eisenzufuhr von täglich Fe⁺⁺ 15 mg. *1* Normaltiere, *2* Werte nach 3tägiger Zufuhr von Fe⁺⁺ 15 mg, *3* Blutungsanämie ohne Fe, *4* Blutungsanämie mit Fe

einem ganz erheblichen Maße verfälscht wurde. In Abb. 3a und b wird die Eisenspeicherung im Interstitium von Dünndarmzotten wiedergegeben.

Um die Eisenresorptionsverhältnisse bei sicher vorhandenem Eisenbedarf prüfen zu können, wurde bei 8 Meerschweinchen eine Blutungsanämie gesetzt. Am 1. Tage erfolgte die Blutabnahme aus der Vena jugularis, am 2. Tage aus der Arteria femoralis. Beide Eingriffe führten wir in Äthernarkose durch. Die Kontrollen des Hämoglobins und der Erythrocyten ergaben pro Tier durchschnittlich eine Abnahme von 15 auf etwa 10 g-% Hb und von 5 Mill. auf etwa 3,5 Mill. Erythrocyten. 24 Std nach der letzten Blutentnahme erfolgte die Tötung. 4 dieser Tiere

erhielten während der Versuchszeit von 3 Tagen jeweils Fe 15 mg oral zugeführt.

Wie die graphische Darstellung in Abb. 4 zeigt, war es zu einem Anstieg der Ferritineisenfraktion im Magen, Duodenum und Dünndarm gekommen, der am stärksten bei der durchgeführten Eisenzufuhr in Erscheinung trat. Das Ferritineisen bei den Tieren, die kein Eisen zugeführt erhielten, war in Leber und Milz gegenüber den Normalwerten erheblich abgesunken. Ein Befund, den wir auch an Ratten schon früher beobachten konnten (Keiderling, Wöhler u. Altmeyer). Bei Eisenzufuhr fanden wir jedoch die Ferritinwerte dieser Organe im Normbereich.

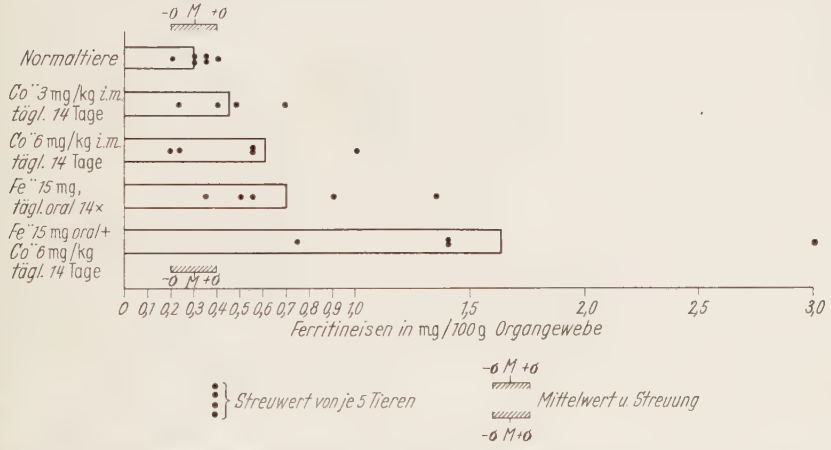


Abb. 5. Ferritineisengehalt im Duodenum und Dünndarm des Meerschweinchens unter verschiedenen experimentellen Bedingungen

Histochemisch war nur unter der Eisenzufuhr im Bereich der Mucosazellen an den Zottenspitzen Eisen zu finden. Dieses Ergebnis macht deutlich, daß der Organismus bei vermehrtem Eisenbedarf vermehrt Eisen resorbiert und dabei Ferritin aufbaut. Entsprechend dem gleichzeitigen Eisenangebot ist der Ferritineisengehalt im Magen-Darmtrakt höher, doch niedriger als bei alleiniger Eisenzufuhr ohne zusätzlichen Eisenbedarf, was wohl dafür spricht, daß vermehrt und schneller Eisen an den Organismus abgegeben wird.

In früheren Untersuchungen über die Kobaltwirkung auf den Eisenstoffwechsel (Wöhler u. Emrich), in denen durch Verfolgung der Zunahme des Hämoglobins und der Erythrocytenwerte ebenfalls ein sicherer Eisenbedarf nachgewiesen werden konnte, sahen wir entsprechend der Dosissteigerung des intramuskulär verabreichten Kobalt-(II)-chlorids ebenfalls eine außerordentlich starke Zunahme der Ferritineisenfraktion des Dünndarmes, wie es in Abb. 5 zur Darstellung kommt. Gleichzeitig war histochemisch vor allem in der lamina propria der Dünndarmzotten eine sehr erhebliche Eisenspeicherung nachzuweisen. Auch in diesen Untersuchungen

stand das Anwachsen der Ferritinfraktion im Dünndarm in einem sicheren Zusammenhang zu der verstärkten Resorption.

Nachdem in den vorhergehenden Untersuchungen aufgezeigt werden konnte, daß die Zunahme der Ferritineisenfraktion im Magen und Darm auch Ausdruck einer vermehrten Resorption sein kann, lag es nahe, die Frage der Eisenresorption durch den Magen nach Abbindung und Abtrennung vom übrigen Darm an Hand der Veränderungen des Ferritingehaltes zu untersuchen. Unter Äthernarkose wurde daher bei 5 Tieren

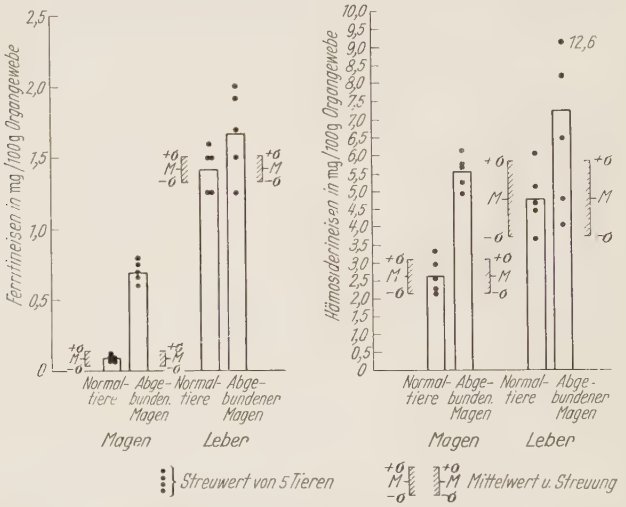


Abb. 6. Ferritin- und Hämosiderineisengehalt des abgebundenen Magens und der Leber, 24 Std nach Gabe von Fe^{++} 30 mg

laparotomiert, der Magen abgebunden und auch nach Abbindung des Duodenums direkt am Pylorus der Magen abgetrennt. Dann injizierte man mittels feinster Kanüle durch die Magenwand in den Speisebrei 30 mg Fe. Erst nach Kontrolle der Einstichstelle, die in keinem Falle eine sichtbare Läsion hinterließ, erfolgte Verschluß der Operationswunde. 24 Std nach der Eisengabe wurden die Tiere zur Untersuchung der Organe durch Nackenschlag getötet. Wie Abb. 6 deutlich werden läßt, war der Ferritineisengehalt im abgebundenen Magen sehr stark angestiegen. Auch die Ferritin- und Hämosiderineisenfraktionen der Leber ließen einen sicheren Anstieg erkennen als Ausdruck der inzwischen eingetretenen Eisenresorption. Der Hämosiderineisengehalt des abgebundenen Magens liegt zu hoch, da, wie die histochemische Untersuchung zeigte, in den Drüsenschläuchen noch viel eisenhaltiger Schleim enthalten war.

Dieses Versuchsergebnis bestätigt die schon früher von Hahn u. Mitarb. sowie von Vahlquist u. Neander durchgeführten Untersuchungen,

die ebenfalls eine Eisenaufnahme durch den Magen wahrscheinlich machten.

Besonders wichtig erscheint, daß auch in dieser Versuchsanordnung trotz einer maximalen Ferritinbildung in der Magenschleimhaut wieder eine Resorption eingetreten ist.

Bei Untersuchungen zur Klärung der von HEILMEYER als erstem beobachteten Veränderungen des Eisenstoffwechsels unter dem Infekt haben wir schon früher

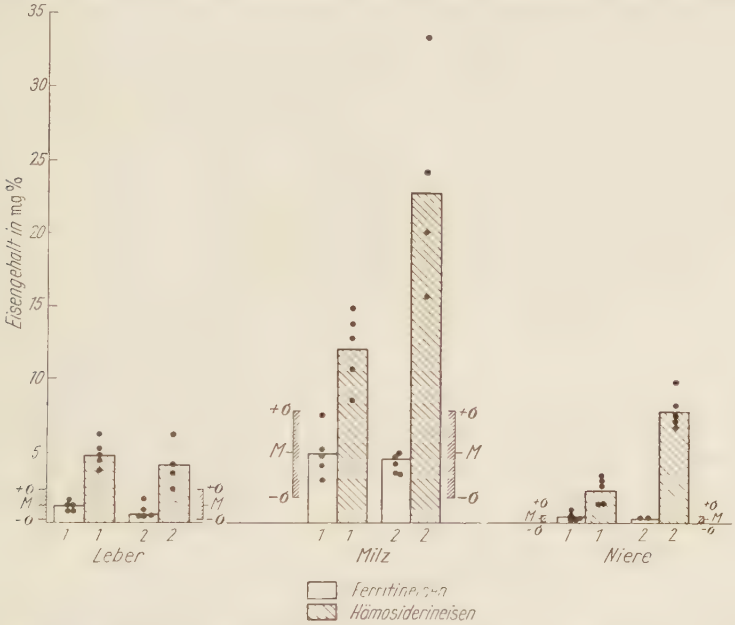


Abb. 7. Verhalten des Ferritin- und Hämosiderineisengehaltes in Leber, Milz und Nier des Meerschweinchens 8 Std nach einmaliger oraler Gabe von Ascorbinsäure 2 g/kg
1 Normaltiere, *2* Werte nach 8 Std Ascorbinsäure

die Ansicht geäußert, daß die Aktivierung des Sulfhydrilsystems mit der weitreichenden Fermentaktivierung beim Infekt zu einer Abspaltung von Eisen-Ionen aus dem Ferritin führen könnte und damit die charakteristischen Veränderungen einer Zunahme des Hämosiderins auslöst. Neuerdings zeigten RUMMEL u. Mitarb., daß der Ascorbinsäure und dem Cystein möglicherweise als Ausdruck ihrer komplexbildenden Eigenschaften die Fähigkeit zukommt, bei oraler Gabe die vermehrte Resorption von Eisen im Magen-Darmtrakt zu fördern.

Bei oraler Verabreichung einer einmaligen, relativ hohen Dosis Ascorbinsäure (2 g pro Kilogramm) beobachteten wir eine erhebliche Eisenverschiebung innerhalb des Organismus. Wie aus Abb. 7 eindrucksvoll hervorgeht, ist es innerhalb von 8 Std zu einem Absinken der Ferritinfraktionen in Leber, Milz und Niere gekommen. Gleichzeitig stieg der Hämosiderineisengehalt der Milz enorm an. Auch in der Niere fand sich ein erheblicher Anstieg der Hämosiderinfraktion. Die von BIELIG

u. Bayer in vitro gezeigte Abspaltung von Eisen-Ionen aus dem Ferritin durch die Ascorbinsäure als Folge ihrer starken Reduktionskraft, läßt sich also auch für den Organismus nachweisen. Dabei übernimmt in erster Linie die Milz, in geringem Ausmaß aber auch die Niere eine Speicherfunktion für die freigesetzten Eisen-Ionen.

Um eine eventuell mögliche verstärkte und über das normale Maß hinausgehende Eisenresorption unter Cystein sicher nachweisen zu

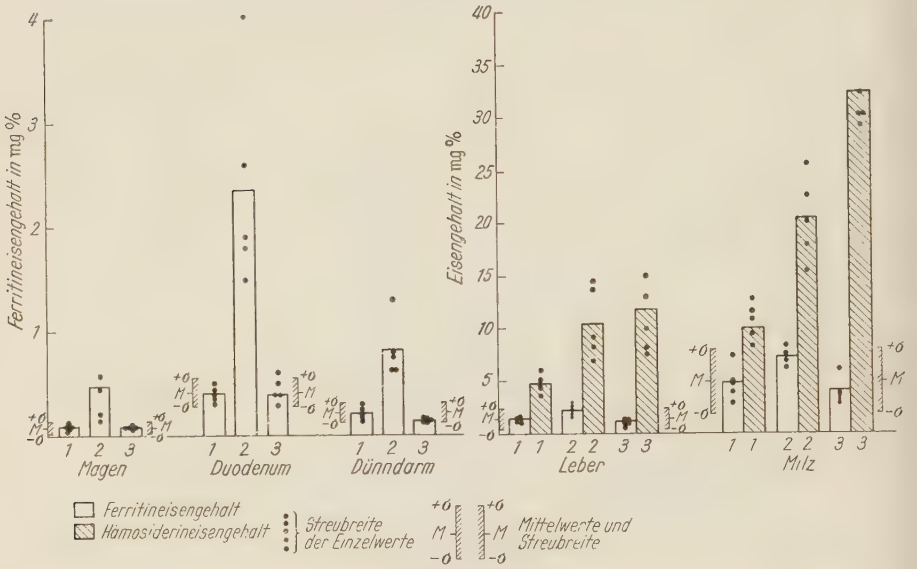


Abb. 8. Verhalten des Ferritin- und Hämosiderineisengehaltes bei 10tägiger oraler Zufuhr von Fe⁺⁺ 15 mg und Gabe von Cystein 200 mg/kg i.p. *1* Normaltiere, *2* Werte nach 10tägiger Zufuhr von Fe⁺⁺ 15 mg, *3* Werte nach 10tägiger Zufuhr von Fe⁺⁺ 15 mg und Cystein 200 mg/kg

können und um dabei für das Verhalten des Ferritineisens im Darm gesicherte Veränderungen zu bekommen, erhielt eine Versuchsgruppe von 5 Tieren an 10 Tagen jeweils 200 mg/kg Cystein i.p. injiziert. Gleichzeitig wurde täglich Fe 15 mg durch die Schlundsonde verabreicht. Wie ein Vergleich mit den Normaltieren und der Tiergruppe, die 10 Tage lang nur Eisen erhielt, zeigt (siehe Abb. 8), liegen die Ferritineisenwerte im Magen-Darmtrakt unerwartet niedrig. Auch die Ferritinwerte von Leber, Milz und Niere sind niedrig und entsprechen allenfalls etwa den Normaltieren. Ausgesprochen hoch liegen dagegen die Hämosiderineisenwerte, insbesondere die der Milz.

Histochemisch überraschte die in keinem Versuch so stark aufgetretene ausgesprochene Eisenspeicherung im Interstitium bzw. der lamina propria der Dünndarmzotten. Weiterhin fand sich eine erhebliche

Eisenanreicherung in der Milz, wie wir sie histochemisch in diesem Maße nur beim Infekt angetroffen haben.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Resorptionsversuchen, bei denen eine erhöhte Resorption mit einer Zunahme des Ferritins im

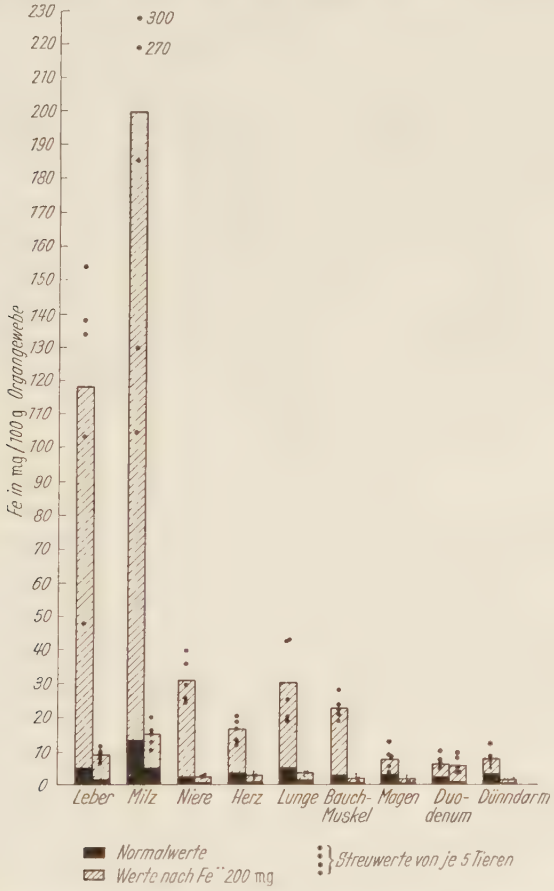


Abb. 9. Verhalten des Ferritin und Hämosiderin-Eisengehaltes in verschiedenen Organen des Meerschweinchens 1 Monat nach i.m. Zufuhr von 200 mg Imferon. *1* Säule — Hämosiderineisen, *2* Säule — Ferritineisen

Magen-Darmtrakt einhergegangen war, fand sich unter Cystein eine vermehrte Resorption — wie sie von Rummel u. Mitarb. mit Radioeisen ebenfalls beobachtet wurde — bei nicht erhöhten Ferritinwerten.

Letztlich interessierte die Frage des Verhaltens von Ferritin- und Hämosiderineisen in Magen und Darm bei maximaler intramuskulär herbeigeführter Eisenüberladung des Organismus, da auch eine Ausscheidung von Eisen über diesen Weg in Betracht gezogen werden muß. Die Ergebnisse der Untersuchungen gibt Abb. 9 wieder. Entgegen dem Verhalten der Eisenverteilung in den Organen, wie

wir sie z. B. bei der sicher durch eine Störung im Resorptionsmechanismus für Eisen hervorgerufenen Hämochromatose finden, wo die Leber als Aufnahmeorgan für aus dem Magen-Darmtrakt zugeführtes Eisen die höchsten Eisenwerte aufweist, liegt bei unserem Versuch die Milz an der Spitze der eisenreichsten Organe. Eindeutig geht aus den Ergebnissen hervor, daß entsprechend der an sich maximalen Eisenzufuhr der Organismus sich bemüht, einen Teil des Eisens in der Form von Ferritin durch eine vermehrte Synthese desselben zu speichern. Dies gelingt jedoch, wie man sieht, nur unvollkommen. Im Magen-Darmtrakt überrascht der hohe Ferritineisengehalt des Duodenums.

Histochemisch besteht insofern ein grundsätzlicher Unterschied zu den bei den Resorptionsversuchen beobachteten Eisenablagerungen im Magen und Darm, als das Eisen vor allem in der Submucosa abgelagert wird. Auch zu unseren früher erhobenen histochemischen Befunden bei der Hämochromatose (Heilmeyer u. Wöhler) besteht ein grundlegender Unterschied, als wir bei diesen Patienten das Eisen fast ausschließlich in den Mucosa- bzw. Epithelzellen der Drüsen von Magenschleimhaut und Duodenum, aber nicht oder nur äußerst selten in der Submucosa und kaum im Interstitium gefunden haben.

Die verhältnismäßig kurze Beobachtungszeit von einem Monat erlaubt keine sehr weitgehenden Schlüsse zu ziehen, doch scheint es uns wichtig, auf diese grundsätzlichen Verschiedenheiten für die Frage Resorption oder Ausscheidung hingewiesen zu haben.

Diskussion

Entsprechend den Untersuchungsergebnissen von Granick konnten auch wir nach Eisengabe eine Vermehrung des Ferritins im Magen- und Darmtrakt, besonders aber im Duodenum beobachten. Daß es sich hierbei aber nicht um einen Blockmechanismus im Sinne einer vollständigen Resorptionssperre handelt, lassen die Bestimmungen des Ferritin- und Hämosiderineisens der anderen Organe zu denselben Zeiten erkennen. Eine Resorptionssperre scheint erst dann einzutreten, wenn eine Absättigung des Organismus mit Eisen vorliegt, wie die Dauerversuche zeigten. Daß dabei der Ferritingehalt höher als normal ist, darf wohl im Sinne einer Sättigung der Mucosazelle mit Eisen gewertet werden. Allerdings machen es die histochemischen Befunde sehr wahrscheinlich, daß trotz dieser Absättigung der Mucosazelle weiter Eisen aufgenommen wird, um aber dann im Interstitium gespeichert zu werden.

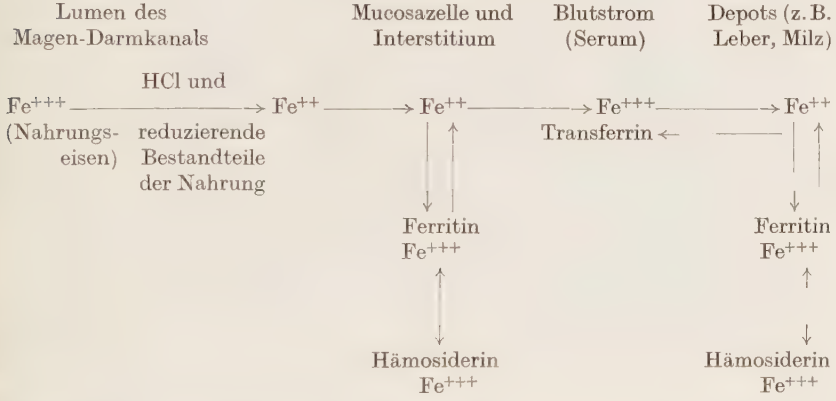
Das Vorhandensein eines bestimmten Ferritingehaltes im Magen, Duodenum und Dünndarm des Normaltieres und parallel dazu auch beim Menschen, wie wir es früher schon nachweisen konnten, läßt vermuten, daß die Eisenresorption in der Mucosazelle immer über das Ferritin verläuft. Eine Durchwanderung der Mucosazelle von Ferro-Ionen, selbst bei geringem Eisenbedarf, erscheint uns wenig wahrscheinlich.

Mit Granick möchten auch wir annehmen, daß das Ferritin bei plötzlichem starkem Eisenangebot eine Auffangfunktion übernehmen kann, die andererseits jedoch eine kontinuierliche Abgabe an das Transferrin gewährleistet. Die durchgeführten Untersuchungen bei erhöhtem

Eisenbedarf des Körpers zeigten, daß die Ferritinvermehrung Ausdruck des Bestrebens eines an Eisen verarmten Organismus sein kann, aus der Nahrung vermehrt Eisen aufzunehmen. Auch in diesen Versuchen überraschte die Eisenspeicherung in der lamina propria.

Diese Befunde machen es wahrscheinlich, daß zwischen der Funktion des Ferritins in den Mucosazellen und der Eisenspeicherung im Interstitium bzw. lamina propria, die auch schon von GRANICK und DE VINALS beobachtet wurde, ein Zusammenhang im Sinne einer Funktionseinheit besteht, etwa so wie wir sie für die Chorionzotten der Placenta

Schema der Eisenresorption



ebenfalls — dort zwischen Chorionsyncytium und Interstitium — haben wahrscheinlich machen können. Damit würden die Zotten gleichzeitig eine Speicherfunktion übernehmen können. Das Schema der Eisenresorption nach GRANICK möchten wir daher wie folgt ergänzen (siehe Schema).

Daß eine verstärkte Eisenresorption jedoch nicht immer mit einer Vermehrung des Ferritins im Magen-Darmtrakt einhergehen muß, läßt der Resorptionsversuch unter Cystein erkennen.

BIELIG u. BAYER konnten in vitro nachweisen, daß Cystein und auch die Ascorbinsäure Ferro-Ionen aus dem Ferritin abspalten. Wir sahen unter der Ascorbinsäure eine Verringerung der Ferritinfraktionen in Leber und Milz, gleichzeitig stieg die Hämosiderinfraktion vor allem in der Milz enorm an. Diese Befunde könnten als eine Reduktionswirkung der Ascorbinsäure auf das Ferritin im Sinne von BIELIG u. BAYER gedeutet werden. Unter Cystein sahen wir im Dauerversuch keine weitergehende Ferritinbildung, wie wir sie unter Eisen allein beobachteten. Der Organismus resorbierte zwar, wie wir sahen, vermehrt, aber eine normale Eisenverwertung konnte nicht stattfinden, sondern das Eisen wurde vor allem in der Milz gespeichert. Die Untersuchungen von RUMMEL u. Mitarb., bei denen Cystein bzw. die Ascorbinsäure oral mit Eisen verabreicht wurden, finden wohl so ihre Erklärung. Es ist wahrscheinlich, daß diese reduzierenden Substanzen nicht mit dem Eisen zusammen

verabreicht werden müssen, um als Transportvehikel zu funktionieren. Diese Erkenntnis, daß bestimmte Stoffwechselvorgänge auch ihre Auswirkung auf den Resorptionsmechanismus in der Mucosazelle haben können, läßt auch für die Hämochromatose und vielleicht auch für die Eisenstoffwechselveränderungen beim Infekt an neue Möglichkeiten denken.

Die Erhöhung des Ferritineisengehaltes in den Organen nach maximaler intramuskulärer Eisenüberladung zeigt das Bemühen des Organismus, das zugeführte Eisen neben der Form des Hämosiderins auch als Ferritin zu speichern.

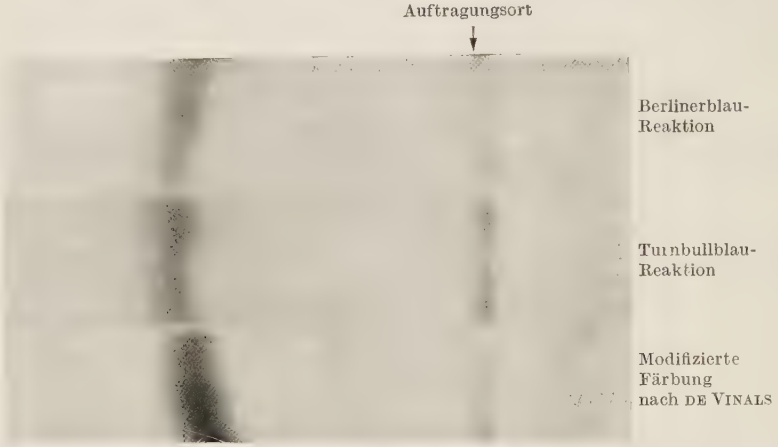


Abb. 10. Vergleichende Anfärbungen quantitativ übereinstimmender Ferritinstreifen, die nach der modifizierten Methode von Keidferling und Wöhler hergestellt wurden

Obwohl in der Art der Eisenverteilung im Magen-Darmtrakt gegenüber der Speicherung bei vermehrter Resorption bzw. bei der Hämochromatose erhebliche Unterschiede bestehen, kann Endgültiges über die Frage der Eisenausscheidung aus dem Magen-Darmtrakt aus unseren Versuchen nicht ausgesagt werden.

Daß die von uns angewandte modifizierte histochemische Eisendarstellung in Gewebsschnitten nach de Vinals gegenüber den anderen bekannten Färbemethoden Vorteile bietet, möchten wir an Abb. 10 demonstrieren. Wie man sieht, führte die Anwendung der genau nach Vorschrift durchgeführten Berlinerblau- bzw. Turnbullblau-Reaktion auch zu einer Anfärbung des Ferritineisens, sie war jedoch wesentlich geringer als mit der von uns benutzten Methode. Es darf wohl hieraus gefolgert werden, und der Vergleich parallel gefärbter Schnitte bestätigt dies, daß die größere histochemische Erfassungsmöglichkeit von Eisen mit der modifizierten Methode nach de Vinals erreicht wird. Dabei erscheint es uns als sehr problematisch, im histologischen Schnitt zwischen Ferritineisen und Hämosiderineisen unterscheiden zu wollen, da das Ferritineisen sicher nur in Spuren in der einzelnen Zelle liegt und man zur quantitativen Bestimmung des Ferritineisens doch immer eine größere Gewebsmenge aufarbeiten muß.

Zusammenfassung

Nach oraler Eisenzufuhr trat eine Vermehrung des Ferritins im Magen- und Darmtrakt, besonders aber im Duodenum ein. Die zur selben Zeit durchgeführten Bestimmungen des Ferritin- und Hämosiderineisens in

anderen Organen machen deutlich, daß diese Ferritinvermehrung im Magen-Darmtrakt nicht Ausdruck eines Blockmechanismus im Sinne von Granick sein kann. Eine Resorptionssperre scheint erst dann einzutreten, wenn eine Absättigung des Organismus mit Eisen vorliegt. Die Tatsache, daß sowohl beim Menschen wie beim Tier im Magen, Duodenum und Dünndarm immer Ferritin nachzuweisen ist, läßt vermuten, daß die Eisenresorption in der Mucosazelle über das Ferritin verläuft und eine Durchwanderung von Ferro-Ionen bei geringem Eisenbedarf, wie es von Granick angenommen wurde, nicht wahrscheinlich ist. Bei plötzlichem starkem Eisenangebot kann das Ferritin eine Auffangfunktion übernehmen, die eine kontinuierliche Abgabe von Eisen an das Transferrin gewährleistet.

Bei erhöhtem Eisenbedarf kann die Ferritinvermehrung Ausdruck des Bestrebens eines an Eisen verarmten Organismus sein, aus der Nahrung vermehrt Eisen aufzunehmen. Bei verstärkter Eisenaufnahme konnte eine Speicherung von Eisen in der lamina propria bzw. dem Interstitium der Zotten nachgewiesen werden. Es wird daraus eine Funktionseinheit zwischen Ferritin und Hämosiderin bei der Eisenresorption angenommen.

Eine verstärkte Eisenresorption kann aber auch mit einer Verminderung des Ferritins im Magen- und Darmtrakt einhergehen, wenn durch reduzierende Substanzen wie das Cystein und die Ascorbinsäure vermehrt Eisen-Ionen vom Ferritin freigesetzt werden. Es tritt dann eine Ablagerung dieser Eisen-Ionen in der Form des Hämosiderins vor allem in der Milz ein.

Eine Eisenresorption durch den Magen konnte durch gleichzeitig durchgeführte Bestimmungen des Ferritin- und Hämosiderineisens von Magen und Leber wahrscheinlich gemacht werden.

Bei maximaler intramuskulär herbeigeführter Eisenüberladung des Organismus wird ein Teil des zugeführten Eisens zu Ferritin aufgebaut.

Schließlich wird über eine neue histochemische Eisendarstellung berichtet. Es wird gezeigt, daß auch die Berlinerblau- und die Turnbullblau-Reaktion in geringem Ausmaß in der Lage sind, das Ferritineisen darzustellen; vollständiger gelingt es mit der beschriebenen Methode.

Fräulein I. Ehret danken wir für ihre Mitarbeit bei den durchgeführten Untersuchungen.

Literatur

Bielig, H. J., u. E. Bayer: Eisenaustausch zwischen Proteinen, Modellversuche zur Eisenresorption und -speicherung im Tierkörper. Naturwissenschaften **42**, 466 (1955). — Granick, S.: Ferritin IX. Funktion des Ferritins bei der Regulation der Eisenresorption. J. of Biol. Chem. **164**, 737 (1946). — Hahn, P. F., W. F. Bale, J. F. Ross, W. M. Balfour and G. H. Whipple: Radioactive iron absorption by gastrointestinal tract: influence of anemia, anoxia and antecendent feeding distribution in growing dogs. J. of Exper. Med. **78**, 169 (1943). - Heilmeyer, L.,

G. Ehrich und G. Lange: Noch unveröffentlicht. Referiert in L. Heilmeyer Eisentherapie. Leipzig: S. Hirzel 1944. — Heilmeyer, L., u. H. Koch: Untersuchungen über die Eisenresorption bei pathologischen Verhältnissen. Dtsch. Arch. klin. Med. **185**, 89 (1939). — Heilmeyer, L., u. K. Plötner: Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit. Jena: Gustav Fischer 1937. — Heilmeyer, L. gemeinsam mit F. Wöhler: Eisenstoffwechseluntersuchungen bei Hämochromatose. 5. Europ. Hämatologen-Kongreß 1955. — Hueck, W.: Pigmentstudien. Beitr. path. Anat. Jena 1937. — Jacobi, H., K. Pfleger und W. Rummel: Komplexbildner und aktiver Eisentransport durch die Darmwand. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 198—206 (1956). — Keiderling, W., u. F. Wöhler: Zur Physiologie und Pathologie des Speichereisens. I. Mitteilung: Eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Ferritins. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 418 (1954). — Keiderling, W., F. Wöhler und H. Altmeyer: Zur Physiologie und Pathologie des Speichereisens, II. Mitteilung: Tierexperimentelle Untersuchungen über Ferritin- und Hämosideringehalt von Leber und Milz unter physiolog. und patholog. Bedingungen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 375 (1954). — Lintzel, W.: Zur Frage des Eisenstoffwechsels, V. Mitteilung: Über den Eisenbedarf des Menschen. Z. Biol. **89**, 342 (1929). — Mazur, A., S. Baez and E. Shorr: J. of Biol. Chem. **213**, 147 (1955). — Neumann, H.: Säuregemischveraschung zur Bestimmung von Eisen, Phosphorsäure, Salzsäure und anderen Aschebestandteilen. Zschr. physiol. chem. **37**, 115 (1902/1903). — Schäfer, K. H., u. A. Breyer: Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Eisenresorption im Infekt. Klin. Wschr. **1956**, 54. — Schmeltzer, W.: Der mikrochemische Nachweis von Eisen in Gewebselementen mittels Rhodanwasserstoffsäure und die Konservierung der Reaktion im Paraffinöl. Zschr. mikrosk.-anat. Forsch., Leipzig **50**, 99 (1933). — Tiermann, J.: Einiges zur Frage der Hämolyse und Genese der Gallenfarbstoffbildung bei Vergiftungen. Görbersdorfer Veröffentlichungen **2** (1898). — Vahlquist, B. C., G. Neander u. N. Neander: Studies on the absorption of iron. I. Absorption of iron from the stomach. Acta paediatr. (Stockh.) **32**, 768 (1945). — Vinals, R. R. de, u. A. del Campo: Tecnica histoquimica pora el Estudio de la Barrera ferrica intestinal. Folia clin. Interuae VI. Mai 1956. — Wöhler, F.: Die Bedeutung des Ferritins für die Eisenübertragung von der Mutter zum Kind. 5. Europ. Hämatologen-Kongreß 1955. — Tierexperimentelle Befunde zum Eisenstoffwechsel unter ACTH und Cortison. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 1956 im Druck. — Wöhler, F., u. D. Emrich: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Kobaltwirkung auf den Eisenstoffwechsel (Speichereisen). Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **28**, 92—100 (1956).

Dr. F. Wöhler, Medizinische Universitätsklinik, Freiburg i. Br., Hugstetterstr. 55

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 125—141 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. Lendle)

Über Kreislauf- und Stoffwechselreaktionen bei der spezifischen Behandlung der Blausäurevergiftung*

Von
H. Mercker und F. Roser

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. November 1956)

Der Erfolg der Behandlung einer Blausäure-Vergiftung kann mit Hilfe verschiedener Testarten beurteilt werden. Verschiebung der LD_{50} für verschiedene CN-Salze, Überlebensdauer bei bestimmter CN-Dosis usw. sind benutzt worden. In diesen Versuchsanordnungen kann das Resultat jedoch durch sekundäre Faktoren beeinflußt werden, von denen der wichtigste der Sauerstoffmangel bei Atemlähmung ist. (Zur Frage der Prüfung zahlreicher Stoffe mit möglicher Wirkung als Antidot bei der Cyanidvergiftung vgl. Forst; Wirth; Keeser; Chen, Rose u. Clowes).

Eine weitere Möglichkeit, objektive Anhaltspunkte für die Schwere der Vergiftung und die Wirksamkeit eines Antidots zu gewinnen, ist unseres Erachtens die fortlaufende Messung der Sauerstoffaufnahme des Organismus und gleichzeitige Beobachtung des Kreislaufs. Durch die Wirkung der Blausäure auf die Gewebsoxydationen kommt es zu einer Minderung der Sauerstoffaufnahme, die leicht fortlaufend quantitativ erfaßt werden kann. Die Wirksamkeit eines Antidots ist dann aus der Beeinflussung der Sauerstoffaufnahme zu beurteilen.

Moller hat die Wirkung der Blausäure auf den respiratorischen Stoffwechsel von Kaninchen untersucht und die Wirkung von Methylenblau als Antidot geprüft. Nach subcutaner Injektion von Cyanid wurden zunächst geringfügige Steigerungen, dann Senkungen der Sauerstoffaufnahme bis auf 20% des Ausgangswertes beobachtet. Methylenblau bewirkte Steigerungen der Sauerstoffaufnahme. Gleichzeitige Beobachtungen am Kreislauf wurden jedoch nicht vorgenommen. Auch finden sich keine Hinweise über das Ausmaß der durch Methylenblau bedingten Hämiglobinbildung. Ferner ist die Frage nicht diskutiert, ob das Methylenblau auf dem Umweg über eine Hämiglobinbildung wirkt oder direkt im Stoffwechsel angreift und die Sauerstoffaufnahme erhöht. Damit im Zusammenhang steht die weitere Frage, ob die so gewonnene

* Herrn Professor Junkmann zum 60. Geburtstag gewidmet.

Energie für den Organismus verwertbar ist. Dies müßte angenommen werden, wenn die Hämiglobinbildung durch Methylenblau zu gering ist, um die Wirksamkeit des Methylenblaus bei der CN-Vergiftung zu erklären. Diese Annahme wurde von Brooks gemacht.

Wir haben daher Versuche durchgeführt, bei denen an Hunden die Sauerstoffaufnahme während der Cyanideinwirkung unter konstanter Beatmung gemessen und der arterielle Blutdruck und der venöse Druck (Druck im rechten Vorhof bei eröffnetem Thorax) registriert wurden. In der gleichen Versuchsanordnung wurde auch die Wirkung von Pharmaka untersucht, die als Antidote bei der Cyanidvergiftung Verwendung finden. Als solche benutzten wir Natriumnitrit, Methylenblau, Natriumthiosulfat und Detoxin[1].

Methodik

Die Versuche wurden an Hunden durchgeführt. Narkose: 4 mg/kg Morphin subcutan, nach ½—1 Std Injektion von 375 mg/kg Urethan und 80 mg/kg Chloralose in Ringerscher Lösung (etwa 3 cm^3/kg) i. m.

Die Tiere wurden mit der Atempumpe gleichmäßig beatmet. Bei Beginn des Versuches wurde zur Lähmung der Atemmuskulatur Flaxedil[1] injiziert, je 2 mg/kg i. v. und i. m. Dadurch wird eine Gegenatmung entgegen der Pumpenbeatmung unter der Cyanidwirkung (gesteigerte Atmung durch Erregung der Chemorezeptoren) vermieden. Gegebenenfalls wurde bei längerer Versuchsdauer die Flaxedil-Injektion wiederholt.

Die prozentuale Sauerstoffausnutzung der Ausatmungsluft wurde mit Hilfe des Gaswechselschreibers nach Rein registriert. Die Ausatmungsluft wurde in ein Mischgefäß geleitet und kontinuierlich zur Analyse entnommen. Dabei wurde der Luftstrom zunächst mit einer Fritte durch eine Silbernitratlösung gesaugt, um gasförmige Blausäure, die auch nach Injektion von KCN oder NaCN in Spuren in der Ausatmungsluft auftritt, zu absorbieren.

Der Blutdruck wurde mit dem Wismut-Manometer nach Hampel in der li. A. femoralis gemessen. Für die Messung des venösen Druckes im re. Vorhof wurde ein Polyäthylenkatheter von der re. V. jugularis ext. aus eingeführt. Der Druck wurde mit Flüssigkeitstransmission auf eine Druckkapsel übertragen und photographisch registriert. Um Einflüsse intrathorakaler Druckänderungen auf den Druck im re. Vorhof auszuschalten, wurde der Thorax eröffnet. Um die Cyanidwirkung möglichst gleichmäßig zu erzielen, wurden Dauerinfusionen der Cyanidlösung in die re. V. brachialis verabfolgt, sonstige i.v. Injektionen in die re. V. femoralis. Für die Infusionen wurde die Heuwingsche Infusionsapparatur benutzt[2].

In Parallelversuchen ohne Zufuhr von Cyanid wurden Bestimmungen der Hämiglobinbildung nach i.v. Injektion von 5 mg/kg Natriumnitrit bzw. 3 mg/kg Methylenblau vorgenommen. Die benutzte Methode entspricht im Prinzip dem

[1] Natrium-Nitrit pro analysi „Riedel de Haën", Natriumthiosulfat pro analysi „Merck", Detoxin (= Keratinhydrolysat) „Bauer und Cie., Johann Wülfing", Düsseldorf, Methylenblau „Merck" (für medizinische Zwecke nach DAB 6) und Flaxedil „Boehringer-Ingelheim" (= 1,2,3,-Tri-(β-triäthyl-ammonium-äthoxy)-benzol-trijodid). — Wir danken den genannten Firmen für die freundliche Überlassung von Versuchsmengen.

[2] Für die Überlassung des Gerätes danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Verfahren von Evelyn u. Malloy. Die Bestimmungen erfolgten mit dem Zeiss-Photometer Elko II. Um den Hämiglobingehalt in g/100 cm³ Blut errechnen zu können, wurde auch der Gesamt-Hb-Gehalt nach Überführung in Cyanhämiglobin ermittelt. (Filter F 53; Maximum bei 530 mμ). Durch Vergleichsmessungen mit dem Unicam-Spektrophotometer wurde die millimolare Extinktion für Cyanhämiglobin für dieses Filter festgestellt. Sie beträgt 10,84. Der Hämiglobingehalt wurde wie folgt bestimmt: Verdünnung des Blutes (mit Phosphatpuffer nach Sörensen von p_H 6,8) 1 : 100, Aufteilung in vier Ansätze. Ansatz 1: Nur Zusatz von H_2O entsprechend den Verdünnungen in den anderen Proben. Ansatz 2: Zusatz von $K_3Fe(CN)_6$, wodurch alles Hb in Hämiglobin umgewandelt wird. Ansatz 3: Zusatz von $K_3Fe(CN)_6$ und KCN, Bildung von Cyanhämiglobin. Ansatz 4: Zusatz von KCN und Bildung von Cyanhämiglobin, sofern Hämiglobin vorhanden ist. Mit dem Filter J 62 (Maximum 620 mμ) wird die Differenz der Extinktionen der Ansätze 2 und 3 gemessen. Sie ist dem Gesamt-Hb-Gehalt proportional. Die Differenz der Extinktionen der Ansätze 1 und 4 ist einem etwaigen Hämiglobingehalt proportional. Extinktion der Messung II (Ansatz 1 gegen 4) dividiert durch Extinktion der Messung I (Ansatz 2 gegen 3), multipliziert mit 100, ergibt den prozentualen Hämiglobingehalt.

Für die Bestimmung des Hämiglobingehaltes wurden für jede Messung 2 cm³ Blut entnommen. 1 cm³ Blut wurde im Verhältnis 1 : 100 mit in Eiswasser gekühltem m/60 Phosphatpuffer (nach Sörensen p_H 6,8) verdünnt und zentrifugiert. Außerdem wurde als Kontrolle folgender Ansatz hergestellt: Plasma (1 cm³), gewonnen 2 min nach der Methylenblauinjektion, wurde einer normalen Blutverdünnung 1 : 100 zugesetzt. Aus dieser Probe ist zu ersehen, welche Hämiglobinmenge während der Aufarbeitung bis zur Messung (nach etwa 2 Std) durch die im Ansatz 1 : 100 vorhandenen Spuren Methylenblau entstehen kann. Die so mögliche Hämiglobinbildung liegt nach unseren Messungen sicher unter 1% und ist zu vernachlässigen[1].

Befunde

1. Verhalten der Sauerstoffaufnahme, des arteriellen Blutdruckes und Venendruckes bei i.v. Infusion von Cyanid

Durch die Dauerinfusion von Cyanid kann innerhalb weniger Minuten die Sauerstoffaufnahme bis auf etwa 70—80% des Ausgangswertes gesenkt werden. Die dafür erforderlichen Dosen von KCN liegen bei 0,1 mg/kg/min. Über längere Zeiten (10—20 min) kann diese Dosis jedoch nicht beibehalten werden, da sie zu weiterer Senkung der Sauerstoffaufnahme und zum Versagen des Kreislaufs führt. Es ist zweckmäßig, die Dosis nach etwa 5—10 min auf 0,05—0,06 mg/kg/min zu erniedrigen. Dadurch läßt sich im allgemeinen eine hinreichend gleichbleibende Senkung der O_2-Aufnahme über längere Versuchszeiten erzielen. Es ist jedoch auch möglich, daß eine weitere Senkung oder ein Wiederanstieg der Sauerstoffaufnahme beobachtet wird. Die Tab. 1 gibt Beispiele für das Ausmaß der Senkung der Sauerstoffaufnahme. Die verschiedenen erforderlichen Dosen des KCN erklären sich aus der Variation der Empfindlichkeit der Versuchstiere.

[1] Wir danken Herrn Dr. Pijper, Medizinische Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft, Physiologische Abteilung, für methodische Hinweise und Kontrollbestimmungen.

Die Infusion wurde so dosiert, daß vor der Gabe des Antidots eine möglichst gleichbleibende Senkung der Sauerstoffaufnahme eingetreten war. In Übereinstimmung mit den Befunden von Møller beobachteten wir im Beginn der CN-Infusion leichte Steigerungen der Sauerstoffaufnahme (s. Tab. 1).

Sofern die Senkung der Sauerstoffaufnahme nicht Werte bis auf etwa 60% erreicht, ist im allgemeinen der Blutdruck normal oder leicht erhöht.

Tabelle 1

Versuch	Infusion KCN mg/kg/min u. Dauer d. Inf.	Senkung O_2-Aufnahme auf % d. Ausgangswertes	Infusion KCN mg/kg/min mit geänd. Dosis fortgesetzt	Senkung O_2-Aufnahme auf % des Ausgangswertes	Tendenz der O_2-Aufnahme gegen Ende der Inf.	Anfängliche Steig. O_2-Aufn. %
11. 11. 55	0,1 f. 8 min	86	0,05 f. 6 min dann 0,075 f. 13 min	94 82	ansteigend gleichbleibend	4
25. 11. 55	0,093 f. 10 min	64	0,06 f. 16 min	54	n. Änder. d. Inf. zunächst weiteres Absinken auf 30%, dann wieder steigend	4
18. 11. 55	0,09 f. 10 min	76	0,03 f. 7 min	82	gleichbleibend	15
16. 12. 55	0,09 f. 10 min	62	0,06 f. 11 min	39	gleichbleibend	2
6. 1. 56	0,09 f. 7 min	71	0,06 f. 5 min	46	fallend	3
30. 1. 56	0,09 f. 5 min	92	0,06 f. 9 min	67	leicht fallend	3
2. 12. 55	0,076 f. 20 min	81	0,118 f. 6 min	72	fallend	—
3. 2. 56	0,075 f. 17 min	54	keine Änderung der Dosis	—	langsam fallend	7
6. 2. 56	0,075 f. 22 min	90	keine Änderung der Dosis	—	gleichbleibend	5
1. 3. 56	0,075 f. 8 min	81	0,045 f. 6 min	64	gleichbleibend	5
20. 12. 55	0,033 f. 27 min	92	keine Änderung der Dosis	—	gleichbleibend	1
20. 12. 55	0,06 f. 22 min	52	keine Änderung der Dosis	—	langsam fallend	13

Namentlich zu Beginn der Infusion wird eine Blutdrucksteigerung beobachtet, die auf die Erregung der Chemoreceptoren durch das Cyanid und deren Einfluß auf das Vasomotorenzentrum zurückzuführen ist. In unserer Versuchsanordnung wird dieser Vorgang besonders deutlich, da eine Hyperventilation durch Chemoreceptorenerregung, verbunden mit Senkung der CO_2-Spannung im Blut, durch die künstliche Beatmung vermieden wird. Durch eine Senkung der CO_2-Spannung würde der Vasomotorentonus vermindert und die von den Chemoreceptoren gleichzeitig ausgelöste reflektorische Blutdrucksteigerung abgeschwächt werden. Auch bei konstanter Beatmung können jedoch noch Änderungen der CO_2-Spannung dadurch auftreten, daß einerseits der Milchsäuregehalt des Blutes ansteigen kann, andererseits die CO_2-Produktion im Gewebe geringer wird, da der Stoffwechsel unter der Cyanidwirkung absinkt. Im Anfang der Cyanidinfusion dürften aber

Abb. 1. Wirkung von Na-Nitrit während einer KCN-Infusion. Registrierungen von oben nach unten: Zeitschreibung 20 sec; arterieller Blutdruck; O_2-Aufnahme = registrierter Ausschlag des Gasanometers des Gaswechselschreibers. Dieser Ausschlag gibt die Sauerstoffverarmung der Ausatmungsluft wieder. Die eingezeichnete Null-Linie entspricht dem Sauerstoffgehalt der Einatmungsluft. Da das Atemvolumen durch Pumpenbeatmung konstant gehalten ist, gibt die Registrierung „O_2-Aufnahme" unmittelbar die Sauerstoffaufnahme in Prozent des Ausgangswertes (= 100%) wieder. Unten auf der Abbildung Venendruck (+ = Druck im rechten Vorhof bei eröffnetem Thorax) und Atemvolumen. Bei *A* Beginn der KCN-Infusion i.v., 0,09 mg/kg/min, bei *B* wird die Dosis erniedrigt auf 0,06 mg/kg/min. Von *C* bis *D* Injektion von Na-Nitrit 5 mg/kg i.v. Die Infusion des KCN wird fortgesetzt. Von *E* bis *F* Kontrolle der Null-Linie des Gaswechselschreibers. Latenzzeit des Gaswechselschreibers = 26 sec

beide Vorgänge noch keine wesentliche Rolle spielen. In späteren Stadien der Cyanidinfusion müßte aber ihre Auswirkung durch Bestimmung der CO_2-Spannung im Blut erfaßt werden können.

2. Wirkung des Natriumnitrits als Antidot

Die i.v. Injektion von Natriumnitrit (5 mg/kg) führt in wenigen Minuten zu einem Wiederanstieg der durch CN gesenkten Sauerstoffaufnahme (Abb. 1 und Abb. 2). Diese Verbesserung der Sauerstoffaufnahme tritt ein, obwohl die KCN-Infusion fortgesetzt wird. Der arterielle Blutdruck verhält sich dabei wechselnd. Ist während der Cyanidinfusion der Blutdruck noch erhöht, kann eine Senkung eintreten; ist aber unter der KCN-Wirkung der Blutdruck abgesunken, kann — offensichtlich durch Verbesserung der Herzleistung — eine Rückkehr zur Norm beobachtet werden. Der Venendruck, der unter der CN-Wirkung erhöht ist, sinkt nach der Natriumnitritgabe ab.

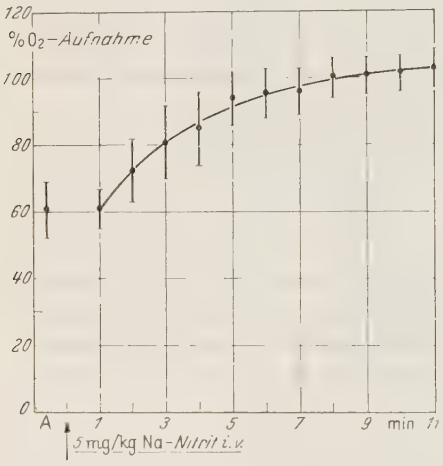


Abb. 2. Verhalten der Sauerstoffaufnahme während KCN-Infusion und nach i.v. Injektion von Na-Nitrit. Bei *A* Mittelwert der erreichten Senkungen der Sauerstoffaufnahme während der KCN-Infusion kurz vor der Injektion des Nitrits. Nach Injektion des Nitrits steigt die Sauerstoffaufnahme in etwa 8 min auf den Ausgangswert (= 100%) wieder an. Mittelwerte aus 5 Versuchen mit der Streuung der Mittelwerte

Es ergibt sich die Frage, ob die Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung durch Nitrit und der CN-Bindung an das Hämiglobin ausreichend ist, um die Wirkung zu erklären.

Da geeignete quantitative Angaben für 5 mg/kg Na-Nitrit i.v. und den Hund als Versuchsobjekt der Literatur nicht zu entnehmen waren, haben wir den Hämiglobingehalt namentlich in den ersten Minuten nach der Injektion des Natriumnitrits gemessen. Die Mittelwertskurven aus drei Versuchen sind in der folgenden Abbildung (Abb. 3) wiedergegeben. Den Werten ist zu entnehmen, daß der Hämiglobingehalt besonders in den ersten Minuten nach der Nitritinjektion rasch ansteigt. In den ersten 6 min werden etwa 0,7 g Hämiglobin in 100 cm^3 Blut gebildet (1,1 g in 6 min bei nur 0,4 g als Ausgangswert). Da der Blutgehalt beim Hund im Durchschnitt mit 70 cm^3/kg bestimmt wurde (Courtice; Weiss), entspricht dieser Hämiglobingehalt $\frac{0{,}7 \cdot 70}{100} \sim 0{,}5$ g Hämiglobin/kg. (Nur das durch Nitrit zusätzlich gebildete Hämiglobin kommt für die

Erklärung der Nitritwirkung bei der CN-Vergiftung in Betracht.) 1 g Hämiglobin bindet ~4 mg KCN. Die durch 5 mg/kg Natriumnitrit in den ersten 6 min gebildete Hämiglobinmenge ist also ausreichend, um 2 mg/kg KCN zu binden. Eine deutliche Senkung der Sauerstoffaufnahme wird bei Infusion von KCN in einer Dosis von 0,09 mg/kg/min bzw. bei fortgesetzter Infusion mit 0,06 mg/kg/min beobachtet. In den ersten 6 min nach der Nitritinjektion wurden bei dieser Infusionsgeschwindigkeit zugeführt: $6 \times 0{,}06 = 0{,}36$ mg KCN/kg, die an das gebildete Hämiglobin gebunden wurden. Darüberhinaus wird aber soviel Hämiglobin gebildet, daß auch das vor der Nitritinjektion zugeführte Cyanid weitgehend gebunden wird. Es ist auch zu erwarten, daß ein Teil des infundierten Cyanids bereits im Zellstoffwechsel entgiftet ist. Quantitativ erscheint also die Hämiglobinbildung nach 5 mg/kg Natriumnitrit ausreichend, um wesentliche Cyanidmengen zu binden.

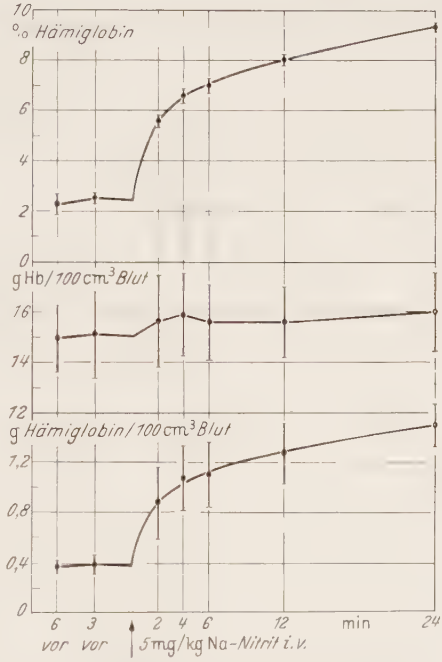


Abb. 3. Hämiglobinbildung nach Injektion von 5 mg/kg Na-Nitrit i.v. Obere Kurve Prozent Hämiglobin, mittlere Kurve Gramm Hb/100 cm³ Blut. (Die Streuung der Mittelwerte ist scheinbar groß. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß zur Vereinfachung der Darstellung in der Ordinatenteilung nur die höheren Werte für Gramm Hb wiedergegeben sind. Der Nullpunkt liegt wesentlich tiefer.) Die untere Kurve gibt die Gramm-Hämiglobin/100 cm³ Blut wieder. Mittelwerte aus 3 Versuchen mit Angabe des mittleren Fehlers der Mittelwerte. Kontrollwerte 6 und 3 min vor Injektion des Na-Nitrits

Der oxydative Stoffwechsel ist durch die Reaktion des CN mit der Cytochromoxydase blockiert. Nach der Nitritinjektion erfolgt in wenigen Minuten eine weitgehende Wiederherstellung der Zelloxydationen. Es muß daher auch die Reaktion: CN-Cytochromoxydase → CN + Cytochromoxydase, die Diffusion des CN aus dem Gewebe in die Blutbahn und die Reaktion: CN + Hämiglobin → CN-Hämiglobin hinreichend schnell erfolgen.

3. Wirkung des Methylenblaus

Da Methylenblau allein eine Steigerung der Sauerstoffaufnahme — namentlich in höherer Dosierung — bewirken kann, haben wir in unseren Versuchen eine niedere Dosis gegeben (3 mg/kg i.v.). Am nicht mit CN

vergifteten Versuchsobjekt führte in eigenen Kontrollversuchen diese Dosis nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Sauerstoffaufnahme und leichten Blutdrucksteigerungen. (Mittelwert für die Steigerung der Sauerstoffaufnahme aus 3 Versuchen (höchster Wert nach 3 min) + 9% ± 3%.) Eine Änderung des venösen Druckes haben wir nicht gesehen. Die gleiche Dosis Methylenblau hat dagegen deutliche Wirkung auf arteriellen und

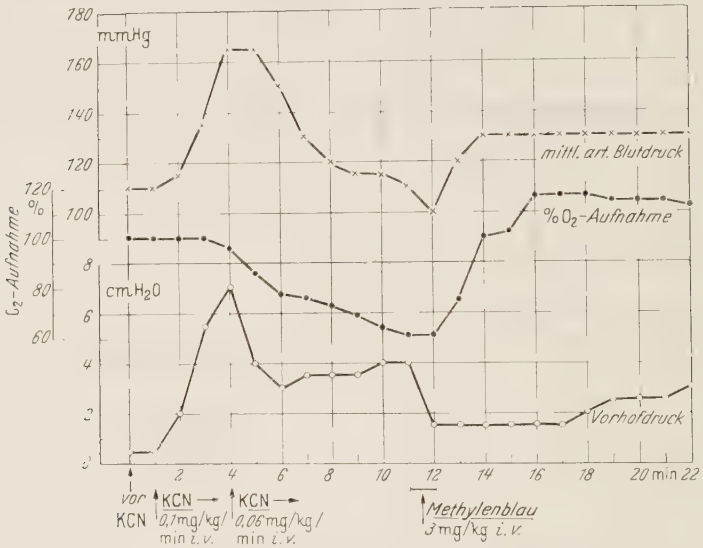


Abb. 4. Wirkung von Methylenblau 3 mg/kg i.v. während einer KCN-Infusion auf mittleren arteriellen Druck (obere Kurve —×—), Sauerstoffaufnahme in Prozent des Ausgangswertes (= 100%) vor Beginn der KCN-Infusion (mittlere Kurve —•—) und den Druck im rechten Vorhof (—○—) bei eröffnetem Thorax

venösen Druck und auf die Sauerstoffaufnahme während einer Dauerinfusion von KCN. Die Abb. 4 gibt gemessene Werte eines Versuches während einer KCN-Infusion und Injektion von Methylenblau (3 mg/kg i.v.). Auch nach der Methylenblauinjektion wurde die KCN-Infusion fortgesetzt. Der Versuch zeigt eindeutig günstige Wirkungen des Methylenblaus bei der CN-Vergiftung.

Bei diesem Effekt des Methylenblaus ist die Frage zu stellen, ob eine quantitativ ausreichende Hämiglobinbildung in so kurzer Zeit erfolgt oder ob die unmittelbare Steigerung der Sauerstoffaufnahme durch Methylenblau für den Organismus verwertbare Energie liefert. Die letzte Möglichkeit ist unseres Erachtens nicht mit Sicherheit auszuschließen. Zwar ist die Steigerung der Sauerstoffaufnahme nach 3 mg/kg Methylenblau i.v. in den Kontrollen gering. Es könnte jedoch sein, daß während der CN-Vergiftung, wenn der aerobe Stoffwechsel gehemmt ist, die Farbstoffkatalyse durch Methylenblau stärker ist. In diesem Sinne kann auf

die in vitro-Versuche von De Meio, Kissin u. Barron Bezug genommen werden. Sie fanden, daß die Steigerung des Stoffwechsels (Sauerstoffaufnahme) durch Farbstoffkatalysatoren dann besonders ausgesprochen ist, wenn der aerobe Stoffwechsel durch CO oder CN gehemmt ist. (Die Frage der Verwertbarkeit der durch Farbstoffkatalyse gewonnenen Energie wird noch in der Diskussion erörtert werden.) Man wird diesen Weg der Methylenblauwirkung bei der CN-Vergiftung dann als weniger wahrscheinlich ansehen, wenn die gleichzeitige Bildung von Hämiglobin ausreichend erscheint. Um diese Frage zu entscheiden, haben wir in Parallelversuchen die Hämiglobinbildung nach Gabe von 3 mg/kg Methylenblau i.v. gemessen. Die Mittelwerte von 5 Versuchen sind in der folgenden graphischen Darstellung (Abb. 5) wiedergegeben. Es wurde gefunden, daß schon in den ersten 2 min nach Beginn der Methylenblauinjektion 0,7 g Hämiglobin in 100 cm³ Blut gebildet werden. Der Hämiglobingehalt fällt in diesen Versuchen, in denen kein CN im Blut vorhanden ist, im Verlauf der folgenden 20 min bereits wieder stark ab. Es ist anzunehmen, daß in Gegenwart von CN aber zunächst Hämiglobincyanid entsteht, das dann wesentlich langsamer gespalten wird.

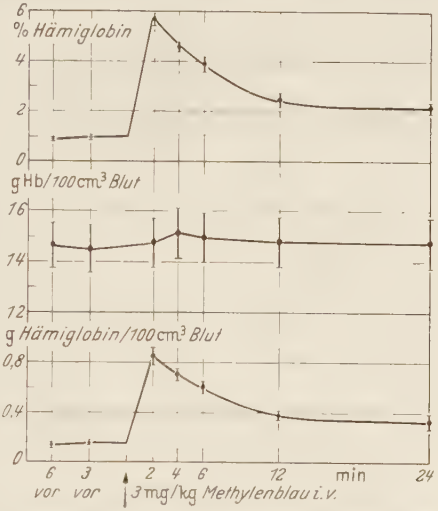


Abb. 5. Hämiglobinbildung nach 3 mg/kg Methylenblau i.v. Darstellung wie Abb. 3. Mittelwerte aus 5 Versuchen mit Angabe des mittleren Fehlers der Mittelwerte

4. Wirkung des Natriumthiosulfats

Natriumthiosulfat wurde während einer KCN-Infusion in 4 Versuchen in einer Dosis von 500 mg/kg gegeben. Es wurde als 25%ige Lösung in 1—2 min injiziert. 3—4 min nach Beginn der Injektion wurde regelmäßig ein Ansteigen der Sauerstoffaufnahme beobachtet. In 7—11 min erreichte die Sauerstoffaufnahme wieder ihre Ausgangswerte vor Beginn der Cyanidinfusion.

Der Blutdruck sank in 3 von 4 Versuchen kurz nach der Injektion des Thiosulfats um etwa 20—30 mm Hg ab, stieg dann aber um 20 bis 30 mm Hg über die Ausgangswerte an. Im weiteren Verlauf sank dann bei fortgesetzter Cyanidinfusion der Blutdruck wieder ab. In einem

Versuch trat die anfängliche Senkung des Blutdruckes kurz nach der Natriumthiosulfatinjektion nicht ein.

Der Druck im rechten Vorhof stieg während und kurz nach der Injektion des Natriumthiosulfats zunächst an (um 3—5 cm H_2O). Darauf folgte eine langsame Senkung auf Werte in der Nähe der Ausgangswerte. In einem Versuch stieg der Vorhofdruck jedoch bereits 4 min nach Beginn der Natriumthiosulfatinjektion wieder an. Die Abb. 6 gibt ein

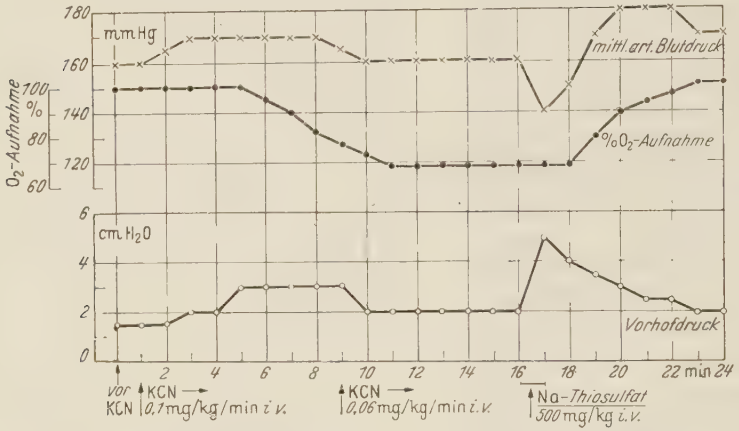


Abb. 6. Wirkung von Na-Thiosulfat 500 mg/kg i.v. während einer KCN-Infusion auf mittleren arteriellen Blutdruck, Sauerstoffaufnahme in Prozent des Ausgangswertes (= 100%) vor Beginn der KCN-Infusion und Druck im rechten Vorhof bei eröffnetem Thorax. Bezeichnungen der Kurven wie in Abb. 4

typisches Verhalten vom mittleren arteriellen Blutdruck, der Sauerstoffaufnahme und des Druckes im rechten Vorhof während Cyanidinfusion und nach Injektion von Natriumthiosulfat (bei fortgesetzter Cyanidinfusion) wieder.

Im Kontrollversuch (Natriumthiosulfat ohne gleichzeitige Cyanidinfusion) führte die gleiche Dosis Natriumthiosulfat zu einer leichten Blutdrucksteigerung ohne vorausgehende Senkung und auch zu einer vorübergehenden Erhöhung des Druckes im rechten Vorhof um 1—2 cm H_2O. Die Sauerstoffaufnahme wurde nicht deutlich beeinflußt.

Da das Natriumthiosulfat als 25%ige Lösung gegeben wurde, betrug für die Dosis von 500 mg/kg die injizierte Flüssigkeitsmenge 2 cm^3/kg. Injektion dieser Menge als Ringer'sche-Lösung führte zu keinen wesentlichen Änderungen im Blutdruck und Druck im rechten Vorhof. Natriumthiosulfat (25%, 500 mg/kg i.v.) hat also offensichtlich Eigenwirkungen am Kreislauf, die aber nicht erheblich sind.

Beurteilt an der Beeinflussung der Sauerstoffaufnahme, dem Blutdruck und dem Druck im rechten Vorhof zeigt das Natriumthiosulfat

in der Dosis von 500 mg/kg eine deutliche günstige Wirkung bei der Cyanidvergiftung.

Auch von Moeschlin wird eine hohe Dosis in der Therapie der CN-Vergiftung empfohlen. Moeschlin gibt an: i.v. Injektion von 12 g Na-Thiosulfat (10% Lösung), bei schweren Fällen Wiederholung bis auf eine Gesamtdosis von 25 g.

5. Wirkung des Detoxins

Detoxin wurde während einer Cyanidinfusion in 3 Versuchen i.v. injiziert. Dosis 0,88 und 1 cm³/kg, injiziert in 2 min, eventuell 2malige

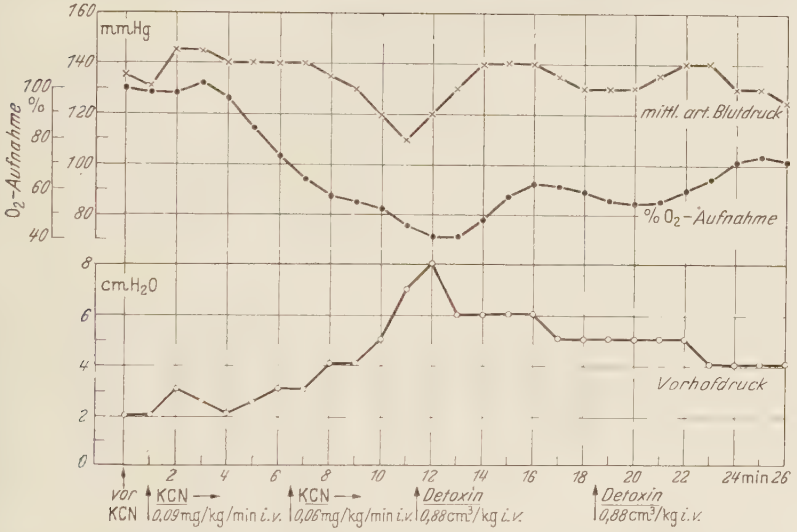


Abb. 7. Wirkung von Detoxin 0,88 cm³/kg i.v. während einer KCN-Infusion auf mittleren arteriellen Blutdruck, Sauerstoffaufnahme in Prozent des Ausgangswertes (= 100%) vor Beginn der KCN-Infusion und Druck im rechten Vorhof bei eröffnetem Thorax. Bezeichnungen der Kurven wie in Abb. 4

Injektion. 3—4 min nach Beginn der Injektion stieg die durch Cyanid gesenkte Sauerstoffaufnahme deutlich an (Abb. 7). Der vorher erhöhte Druck im rechten Vorhof wurde deutlich gesenkt. Im arteriellen Blutdruck wurde in dem einen Versuch eine Steigerung, in dem anderen Versuch keine wesentliche Änderung beobachtet. Bei fortgesetzter Cyanidinfusion waren die günstigen Wirkungen des Detoxins aber nur vorübergehend zu beobachten. 8—10 min nach der Injektion zeigte die Sauerstoffaufnahme wieder fallende Tendenz. Eine zweite Detoxin-Injektion war jedoch wieder wirksam. Eigenwirkungen des Detoxins (ohne gleichzeitige Cyanidinfusion) auf Blutdruck, Druck im rechten Vorhof und auf die Sauerstoffaufnahme wurden mit der Dosis von 1 cm³/kg nicht beobachtet.

Diskussion

Im Vergleich mit dem Verhalten des respiratorischen Stoffwechsels bei Hypoxie durch Unterdruck oder Atmung sauerstoffarmer Gemische ist das Ausmaß der möglichen Senkung des Stoffwechsels bei der CN-Vergiftung auffallend.

Im allgemeinen Sauerstoffmangel sinkt nach Opitz u. Schneider die Sauerstoffaufnahme des Gesamtorganismus erst dann ab, wenn der Blutkreislauf zusammenbricht. Von mehreren Untersuchern (Rühl; Benzinger; Jouck) werden sogar Steigerungen der Sauerstoffaufnahme während Hypoxie beschrieben.

Im Beginn einer Sauerstoffmangelatmung werden allerdings Senkungen der Sauerstoffaufnahme gefunden, die aber mit der Durchmischung der in der Lunge vorhandenen Luft mit dem Sauerstoffmangelgemisch und der Herstellung eines neuen Gleichgewichtes in der Sauerstoffverteilung im Organismus — geringe Sättigung des Hämoglobins und niedere Sauerstoffdrucke im Gewebe — zusammenhängen.

Die Ursache für das verschiedene Verhalten der Sauerstoffaufnahme bei allgemeiner Hypoxie und bei der CN-Vergiftung dürfte wohl darin liegen, daß bei allgemeiner Hypoxie zuerst das Zentralnervensystem und dann Herz und Kreislauf versagen, während die Versorgung der Muskulatur beim ruhenden Organismus und solcher Organe, die einen niederen Sauerstoffbedarf oder gute Anpassungsmöglichkeiten haben, noch nicht betroffen ist. Quantitativ fällt dann in der Gesamt-Sauerstoffaufnahme eine etwaige Stoffwechselsenkung des Gehirns, die schon zu schweren funktionellen Störungen führt, nicht ins Gewicht. Im Gegensatz hierzu sind bei der CN-Vergiftung die Zelloxydationen in *allen* Geweben betroffen, wodurch eine Senkung in der Gesamt-Sauerstoffaufnahme eher deutlich wird.

Es ist auch daran zu denken, daß möglicherweise bei der schnell verlaufenden CN-Vergiftung die verschiedenen Gewebe und Organe quantitativ nicht gleichmäßig betroffen werden. Unterschiede in der Capillarisierung, der Durchblutung und den Diffusionsbedingungen können die Verteilung des CN und die Aufsättigung der Gewebe mit CN beeinflussen. Es ist auch vorstellbar, daß die Entgiftungsmöglichkeiten in den verschiedenen Organen nicht gleich groß sind. Zur Entscheidung dieser Fragen müßte jedoch der lokale Stoffwechsel während der CN-Vergiftung gemessen werden.

Die Dosen Cyanid, die in unseren Versuchen bei fortlaufender Infusion Senkungen der Sauerstoffaufnahme bewirkten, entsprechen denen, die in den Versuchen von Ward zu Veränderungen im Elektrokardiogramm und Elektroencephalogramm führten. Ward infundierte bei Katzen NaCN zwischen 0,018 und 0,1 mg/kg/min. (0,024 und 0,132 mg/kg/min KCN bzw. 0,0095 und 0,053 mg/kg/min CN entsprechend).

Kurz nach Beginn der KCN-Infusion haben wir allgemein eine vorübergehende geringe Steigerung der Sauerstoffaufnahme gefunden. Dieser

Befund stimmt mit der Beobachtung von Møller überein. Møller führt diese anfängliche Steigerung der Sauerstoffaufnahme auf eine Ausschüttung von Adrenalin zurück. Wir haben diesen Effekt nicht weiter analysiert. Es kann jedoch aus unseren Versuchen mit konstanter Pumpenbeatmung und Lähmung der Atemmuskulatur geschlossen werden, daß die Steigerung der Sauerstoffaufnahme auch ohne Änderung der Atemarbeit auftritt, die als Ursache mit in Betracht kommt.

Der arterielle Blutdruckanstieg im Beginn der CN-Vergiftung ist unseres Erachtens auf die Chemoreceptorenerregung durch das CN zurückzuführen. Von Heymans, Bouckaert, Euler u. Dautrebande; Bjurstedt u. v. Euler; Bernthal; Neil wurde der Einfluß der Chemoreceptorenerregung auf den Kreislauf nachgewiesen und eingehend untersucht. Wie bereits eingangs erwähnt wurde, ist in unseren Versuchen die Blutdrucksteigerung besonders ausgesprochen, weil eine gleichzeitige Senkung der CO_2-Spannung als Folge einer Atmungssteigerung durch die konstante Beatmung vermieden wurde.

Nicht mit Sicherheit ist die Frage zu entscheiden, ob der Anstieg des venösen Druckes während der CN-Infusion möglicherweise ganz oder zum Teil durch vasomotorische Reflexe von den Chemoreceptoren bedingt ist. Auch bei Carotidenabklemmung wurde von Charlier u. Philippot ein geringer Anstieg des Druckes im rechten Vorhof beobachtet (um 0,5 bis 1,5 cm H_2O bei geschlossenem Thorax). Soweit wir Injektionen von CN in die Carotiden durchgeführt haben, sahen wir keine oder nur geringfügige Anstiege des venösen Druckes. In solchen Versuchen fehlt jedoch der Anteil der Chemoreceptoren des Aortenbogens. Wir möchten annehmen, daß der Anstieg des venösen Druckes während der CN-Infusion zum Teil durch vasomotorische Reflexe von den Chemoreceptoren und zum Teil durch eine Herzinsuffizienz bedingt ist. Gleichzeitige Messungen des Herzminutenvolumens könnten hier weiterführen. Für eine Herzmuskelschädigung dürften auch die häufig zu beobachtenden Pulsirregularitäten sprechen. Paulet nimmt an, daß das Herzversagen der wesentliche Faktor bei einer tödlich verlaufenden Cyanidvergiftung ist.

Die Messungen der Hämiglobinbildung in den ersten Minuten nach der Injektion zeigen, daß die Bildung von Hämiglobin bei den von uns benutzten Nitritdosen (5 mg/kg) und Methylenblau (3 mg/kg) ausreichend ist, um die Entgiftung des Cyanids zu erklären. Für das Nitrit kommt auch bekanntlich keine andere Wirkungsweise in Betracht. Beim Methylenblau ist jedoch noch zu berücksichtigen, daß die Sauerstoffaufnahme in vitro und in vivo durch Methylenblau gesteigert wird.

Auch in Gegenwart von Cyanid tritt dieser Effekt auf und ist dann sogar besonders ausgesprochen. An einigen Geweben (Niere, Leber, Testis) soll die Farbstoffkatalyse bei normaler Atmung fehlen, soll jedoch auftreten, wenn die Atmung durch

Cyanid oder Kohlenmonoxyd gehemmt wurde. Es wird angenommen, daß die Milchsäurebildung die Ursache für den Unterschied ist (De Meio, Kissin u. Barron). Zwar ist in unseren Kontrollversuchen ohne Cyanid bei Gabe von 3 mg/kg Methylenblau i.v. die Steigerung der Sauerstoffaufnahme gering. Wenn sie aber in Gegenwart von Cyanid stärker ist, kann der Anstieg der Sauerstoffaufnahme nach Methylenblau während der Cyanidinfusion auch mit durch diesen farbstoffkatalytischen Effekt des Methylenblaus bedingt sein.

Für eine etwaige Verwendung des Methylenblaus als Antidot ist auch die Frage zu stellen, ob diese Farbstoffkatalyse eine zusätzliche Belastung im Zellstoffwechsel darstellt oder ob sie für die Zellen verwertbare Energie liefert. Die stoffwechselsteigernde Wirkung des Methylenblaus (auch in Gegenwart von Cyanid) (Thunberg) war ursprünglich der Grund für dessen Einführung in die Therapie (Sahlin, Eddy). Von Hug wurde dann die indirekte Wirkung über die Hämiglobinbildung angenommen. Desgleichen ist Heubner der Ansicht, daß Methylenblau nur insofern ein Gegenmittel gegen Cyanid ist, als es Hämiglobin erzeugt.

In der Literatur gibt es auch Hinweise dafür, daß die Energie, die durch die farbstoffkatalytische Wirkung des Methylenblaus auf den Stoffwechsel freigesetzt wird, nicht verwertbar ist. Schmitt u. Schmitt beobachteten, daß die durch Cyanid erniedrigte Atmung des Froschnerven durch Methylenblau wieder hergestellt wird, jedoch nicht das Aktionspotential. Korr fand, daß die durch Cyanid gehemmte Atmung befruchteter Seeigeleier durch Methylenblau erhöht wurde, jedoch teilten und entwickelten sich die Zellen nicht. Ob Gleiches nun auch für andere Zellfunktionen, z. B. die Muskelkontraktion gilt, läßt sich aus der Literatur nicht beantworten.

Für das Ausmaß der Hämiglobinbildung durch Methylenblau ist von Bedeutung, daß bei höheren Hämiglobinwerten das Methylenblau das Hämiglobin auch zu Hämoglobin reduziert (Kiese; Bodansky), weshalb das Methylenblau auch in der Behandlung von Hämiglobinämien benutzt wird. Ob nun jedoch in Gegenwart von Cyanid durch die Bildung von Cyanhämiglobin das Gleichgewicht verschoben wird, indem fortlaufend weiteres Hämiglobin gebildet wird, ist experimentell noch nicht geklärt.

Bei der praktischen Verwendung des Methylenblaus sollten auch mögliche toxische Wirkungen berücksichtigt werden, worauf bereits von Sahlin hingewiesen wurde. Nadler, Green u. Rosenbaum haben hierzu experimentelle Untersuchungen an gesunden Versuchspersonen durchgeführt und fanden bei intravenöser Injektion von 50 cm^3 1%iger Lösung (also etwa 7 mg/kg entsprechend), in 10 min gegeben, im EKG eine Abflachung der T-Zacke, Paraesthesien und gastrointestinale Reizungen. Die Veränderungen hielten 24—48 Std an. Das Methylenblau war in drei bis fünf Tagen eliminiert. Bei den älteren Untersuchungen von Lundberg über die pharmakologischen Eigenschaften des Methylenblaus, die ebenfalls in diesem Zusammenhang zu nennen sind, wurden allerdings im Tierversuch verhältnismäßig hohe Dosen (bis 25 mg/kg) gegeben.

Natriumthiosulfat und Detoxin führten in unseren Versuchen mit fortgesetzter Cyanidinfusion zu einer Verbesserung der Sauerstoffaufnahme. Der Effekt war beim Detoxin jedoch nur vorübergehend zu

beobachten. Auch in den Versuchen von Chen, Rose u. Clowes erwies sich sowohl das Natriumthiosulfat als auch das Natriumtetrathionat als wirksam.

Clemedson, Hultmann u. Sörbo haben versucht, den Thiosulfateffekt noch durch gleichzeitige Gabe von Rhodanese zu steigern, da dieses Ferment nach den Untersuchungen von K. Lang bei der Entgiftung der Blausäure eine Rolle spielt. Die Versuche wurden an Kaninchen durchgeführt. Es wurde die mögliche Steigerung der LD_{50} nach Vorbehandlung mit Thiosulfat bzw. Tetrathionat plus Rhodanese geprüft. Sowohl die intravenöse als auch die subcutane LD_{50} wurden durch Thiosulfat bzw. Tetrathionat und stärker noch durch Thiosulfat plus Rhodanese erhöht. Wir haben bislang jedoch keine Hinweise in der Literatur gefunden, ob sich diese interessante Kombination bewährt hat.

Zusammenfassung

An Hunden in Narkose wurden Sauerstoffaufnahme, Blutdruck und Vorhofdruck während einer Cyanidvergiftung (durch i.v. Infusion von KCN) und während der Wirkung eines Antidots fortlaufend gemessen. Es wurde gefunden:

1. Die Sauerstoffaufnahme kann durch Infusion von KCN (Dosis: 0,1 mg/kg/min bzw. bei länger fortgesetzter Infusion 0,06 mg/kg/min) um 20—30% gesenkt werden, ohne daß es zu einem Kreislaufversagen kommt. Der Druck im rechten Vorhof wird allerdings erhöht.

2. Nach Na-Nitrit- und Methylenblauinjektion während der Cyanidinfusion steigt die erniedrigte Sauerstoffaufnahme an. Für das Methylenblau ist dabei die katalytische Wirkung als reversibler Farbstoff auf den Stoffwechsel zu berücksichtigen.

3. Auch für das Natriumthiosulfat und für das Detoxin lassen sich günstige Wirkungen auf die Sauerstoffaufnahme und den Kreislauf während der Cyanidvergiftung nachweisen.

Die Arbeit wurde mit Mitteln durchgeführt, die dem Direktor des Pharmakologischen Institutes, Herrn Professor Lendle, von der Research Corporation New York zur Verfügung gestellt wurden.

Literatur

Benzinger, Th.: Untersuchungen über die Atmung und den Gasstoffwechsel, insbesondere bei Sauerstoffmangel und Unterdruck, mit fortlaufend unmittelbar aufzeichnenden Methoden. Erg. Physiol. **40**, 1 (1938). — Bernthal, Th.: Chemoreflex control of vascular reactions through the carotid body. Amer. J. Physiol. **121**, 1 (1938). — Bjurstedt, H., u. U. S. v. Euler: Blutdrucksteigerung durch hypoxische Erregung der Chemoreceptoren beim Hund. Acta physiol. scand. (Stockh.) **4**, 175 (1942). — Bodansky, O.: Methemoglobinemia and Methemoglobin-producing compounds. Pharmacol. Rev. **3**, 144 (1951). — Brooks, M. M.: Effect of Methylene blue on CN and CO poisoning. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **29**, 1228 (1931/32). — Mechanism of Methylene blue in CO poisoning. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **34**, 48 (1936). — Charlier, R., et E. Philippot: Modifications circulatoires engendrées

par l'occlusion des carotides chez le chien. C. r. Soc. Biol. (Paris) **141**, 203 (1947). — Chen, K. K., Ch. L. Rose and G. H. A. Clowes: Comparative values of several antidotes in cyanide poisoning. Amer. J. Med. Sci. **188**, 767 (1934). — Clemedson, C. J., H. J. Hultman and Bo Sörbo: The antidote effect of some sulfur compounds and rhodanese in experimental cyanide poisoning. Acta physiol. scand. (Stockh.) **32**, 245 (1954). — Courtice, F. C.: The blood volume of normal animals. J. of Physiol. **102**, 290 (1943). — Eddy, N. B.: Regulation of respiration. The antagonism between methylene blue and sodium cyanide. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **41**, 449 (1931). — Evelyn, A., and H. T. Malloy: Microdetermination of Oxyhemoglobin, Methemoglobin and Sulfhemoglobin in a single sample of blood. J. of Biol. Chem. **126**, 655 (1938). — Forst, A. W.: Zur Entgiftung der Blausäure. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **128**, 1 (1928). — Hampel, A.: Elektrisches Transmissionsmanometer auf der Grundlage elektrischer Widerstandsänderungen des Wismuts im Magnetfeld. Pflügers Arch. **244**, 171 (1940). — Heubner, W.: Methämoglobinbildende Gifte. Erg. Physiol. **43**, 9 (1940). — Heymans, C., J. J. Bouckaert, U. S. v. Euler et L. Dautrebande: Sinus carotidiens et réflexes vasomoteur. au sujet de la sensibilité réflexogène vasomotrice des vaisseaux artériels aux excitants chimiques. Arch. internat. Pharmacodynamie **43**, 86 (1932). — Hug, E.: L'intoxication par l'acide cyanhydrique. Action antidote du blue de méthylene, du nitrite de sodium et du sulfure de sodium. C. r. Soc. Biol. (Paris) **111**, 89 (1932). — L'intoxication par l'acide cyanhydrique. Les substances méthémoglobinisants comme antidotes de l'intoxication cyanhydrique. C. r. Soc. Biol. (Paris) **112**, 511 (1933). — Jouck, K. Th.: Über den Sauerstoffverbrauch und Wärmehaushalt im Sauerstoffmangel. Luftfahrtmedizin **9**, 26 (1944). — Keeser, E.: Über Entgiftungsmöglichkeiten im Organismus. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **122**, 82 (1927). — Kiese, M.: Die Reduktion des Hämiglobins; die katalytische Wirkung einiger Farbstoffe auf die Reduktion des Hämiglobins in roten Zellen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 288 (1947). — Korr, J. M.: Cold Spring Harbor Symposia. Quant. Biol. **7**, 74, 120 (1934); zit. bei Lemberg, R., and J. W. Legge: Hematin compounds and bile pigments, S. 383. New York: Interscience Publ. Inc. 1949. — Lang, K.: Die Rhodanbildung im Tierkörper. Biochem. Z. **259**, 243 (1933). — Lundberg, H.: Untersuchung über die pharmakologischen Eigenschaften des Methylenblaus. Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **45**, 237 (1924). — De Meio, R. H., M. Kissin and E. S. G. Barron: Studies on biological oxydations. IV. On the mechanism of the catalytic effect of reversible dyes on cellular respiration. J. of Biol. Chem. **107**, 579 (1934). — Moeschlin, S.: Klinik und Therapie der Vergiftungen, 2. Aufl., S. 210. Stuttgart 1956. — Møller, K. O.: Die Wirkung der Blausäure auf den respiratorischen Stoffwechsel des Gesamtorganismus. Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **72**, 103 (1935). — Die Wirkung von Methylenblau und die kombinierte Blausäure-Methylenblauwirkung auf den respiratorischen Stoffwechsel des Kaninchens. Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **72**, 115 (1935). — Nadler, J. E., H. Green and A. Rosenbaum: Intravenous injection of methylene blue in man with reference to its toxic symptoms and effect on the electrocardiogramm. Amer. J. Med. Sci. **188**, 15 (1934). — Neil, E.: Chemoreceptor areas and chemoreceptor circulatory reflexes. Acta physiol. scand. (Stockh.) **22**, 54 (1951). — Opitz, E., u. M. Schneider: Über die Sauerstoffversorgung des Gehirns und den Mechanismus von Mangelwirkungen. Erg. Physiol. **46**, 126 (1950). — Paulet, G.: De l'importance relative de la défaillance respiratoire et de la défaillance cardiaque dans l'action léthale des cyanures. Arch. internat. Physiol. **63**, 328 (1955). — Rein, H.: Elektrische Gaswechselschreibung an Tier und Mensch. Hdb. Biol. Arbeitsmeth. IV/**13**, 795 (1937). — Rühl, A.: Über den Arbeitsstoffwechsel bei Sauerstoffmangel. Luftfahrtmedizin **1**,

241 (1937). — Sahlin, Bo: Über den Antagonismus zwischen Methylenblau und Cyankalium. Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **47**, 284 (1926). — Schmitt, F. O., and O. H. A. Schmitt: The nature of the nerve impulse. II. The effect of cyanides upon medullated nerves. Amer. J. Physiol. **97**, 302 (1930). — Thunberg, T.: Zur Kenntnis der Einwirkung tierischer Gewebe auf Methylenblau. Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **35**, 163 (1918). — Ward, A. A.: Sodium cyanide: Time of appearance of signs as a function of the rate of infusion. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **64**, 190 (1947). — Weiss, J. W.: Wirkung hypertonischer Glukose-Lösungen auf den Kreislauf. Diss. Göttingen 1951. — Wirth, W.: Experimentelle Studien zur Behandlung der Vergiftung durch Blausäure-Einatmung. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **179**, 558 (1935).

Prof. Dr. H. Mercker, Pharmakologisches Institut der Universität, Göttingen, Geiststr. 9

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 142—154 (1957)

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. Hans Schaefer)

Über die Wirkung von 2-Methyl-2-Hydroxy-6-Aminoheptan (MH) auf Kreislauf und Atmung*

Von
H. Hille und H.-J. Teske

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Oktober 1956)

Es ist seit langem bekannt, daß die aliphatischen Amine kreislaufwirksam sind und daß bei Verbindungen mit 6- und 7 C-Atomen ein Maximum der Wirksamkeit liegt. Eine therapeutische Verwendung hat diese ganze Stoffklasse bis auf wenige Ausnahmen jedoch nicht gefunden. 1949 entdeckten Walton u. Brodie, daß MH eine besonders große positiv inotrope Wirkung besitzt. Weitere Untersucher Garett; Giraud, Loubatiers u. Latour fanden, daß es ferner die Coronargefäße erweitert und die Diurese verstärkt. Die Substanz ist ein farbloses Pulver, das aus dem indischen Lemongras (Cymbotogon flexus und citratus) gewonnen wird.

Wir stellten uns die Aufgabe, die Wirkung von MH im Tierexperiment systematisch zu analysieren; insbesondere das Zusammenspiel von Herz und peripherem Kreislauf, da hier in der Literatur Widersprüche vorhanden sind, deren Klärung experimentell nicht angegangen wurde.

Methodik

Wir prüften die Wirkung der Substanz an 41 Hunden vom Gewicht zwischen 15—30 kg. Sie wurden mit 70,0 mg/kg Chloralose in 1,4 cm^3/kg 25%iger Urethanlösung narkotisiert. Alle Tiere außer denen, bei denen die Diurese gemessen wurde, erhielten vor der Narkose Morphium (0,5 mg/kg s.c.).

Zur Druckmessung am großen Kreislauf verwendeten wir auf der arteriellen Seite ein Kapazitäts-Druckmeßgerät nach Neuhaus, dessen Meßkopf endständig in die Art. brach. eingebunden wurde, auf der venösen Seite ein Straingage-Manometer von Statham, das an einen in die V. jug. eingeführten Katheter angeschlossen war. Die Druckmessungen im kleinen Kreislauf wurden in anderen Versuchen sowohl arteriell als auch venös mit Straingage-Manometern vorgenommen, deren Meßkammern mit dem Blutkreislauf über Katheter verbunden waren, die in kleine Nebenäste eingebunden wurden. Die Herzfrequenz schrieben wir mit einem Zeitordinatenschreiber nach Schaefer, Bleicher u. Eckervogt, den das Druckmeßgerät

* Der Firma Atmos danken wir für die Überlassung des Präparates.

steuerte. Die Durchblutung der Gefäße wurde mit asymmetrischen Thermoelementen meist blutig gemessen. Die Präparation der untersuchten Gefäße wurde an anderer Stelle (Hille u. Teske) ausführlich beschrieben. Die Diurese registrierten wir mit einem elektrischen Tropfenzähler. Das Atemvolumen und den Gasaustausch in den Lungen ermittelten wir mit dem Grundumsatzgerät von Hartmann & Braun, dessen Mischflasche für die Tierexperimente auf 150 cm^3 verkleinert wurde. Die Dosis letalis bestimmten wir an 42 weißen Mäusen, denen wir die Substanz intraperitoneal injizierten. Die Beobachtungsdauer betrug 24 Std. Die Ergebnisse wurden nach der Methode von Behrens u. Kärber ausgewertet.

Der Blutdruck im großen Kreislauf

Den Blutdruck im großen Kreislauf registrierten wir bei allen Versuchen. Er steigt bei intravenösen Injektionen von MH mit zunehmender Dosis parallel an. Bei niedriger Dosierung (0,5 bis 3,0 mg/kg i.v.) wird nur der systolische Druck verändert, die Blutdruckamplitude wird also größer. Werden höhere Dosen injiziert, dann steigt auch der diastolische Druck an (Abb. 1). Im Dosisbereich bis zu 10.0 mg/kg MH i.v. verläuft die Druckreaktion einsinnig. Es wird nach 1 bis 2 min der Höchstwert erreicht, danach erfolgt innerhalb von 10—30 min ein stetiger Abfall zum Ausgangswert. Bei höherer Dosierung reagieren 50% der Tiere mit einer biphasischen Druckkurve. Der Druck erreicht hier rascher als sonst sein Maximum und fällt innerhalb von 1—2 min wieder ab, wobei der systolische Druck die Ausgangshöhe erreicht, der diastolische Druck jedoch darunter absinkt.

Diese Befunde lassen noch nicht die Entscheidung zu, ob die Druckwirkung nach MH durch kardialen oder periphen Angriff zustande kommt, insbesondere ob sie bei kardialem Angriffspunkt auf der oft beobachteten Frequenzsteigerung (vgl. S. 146) oder auf einem positiv inotropen Effekt beruht. Alle Möglichkeiten sind, wie sich zeigt, verwirklicht.

Für einen kardialen inotropen Angriff spricht, daß bei Injektionen von 0,02—0,2 mg/kg MH in die A. coronaria der Blutdruck, freilich nur wenig, ansteigt, obgleich es sich dabei um eine im peripheren Gesamtkreislauf sicher unwirksame Dosis handelt und die Herzfrequenz noch konstant bleibt. Für einen peripheren Angriff mit dilatierender Wirkung sprechen die später beschriebenen intraarteriellen Injektionen; dabei vor allem, daß bei Gaben von 0,5—2,0 mg/kg MH in eine Femoralarterie der Blutdruck sowohl systolisch als auch diastolisch absinkt, während diese Dosen intravenös gegeben zum Druckanstieg führen. Für dieses Phänomen kommen drei Erklärungsmöglichkeiten in Betracht. Einmal könnte die Extremität als Blutspeicher wirken, da die Durchblutung der A. fem. erheblich zunimmt. Das MH bliebe dann längere Zeit im Blutspeicher liegen und würde bereits in der Peripherie weitgehend abgebaut. Dies ist jedoch bei MH sehr unwahrscheinlich. Seine Wirkung hält bei i.v. Injektionen so lange an, daß nicht mit einem raschen Abbau zu

rechnen ist. Zweitens könnte die Peripherie verhältnismäßig stärker reagieren als das Herz, weil sie MH bindet und aus dem rückströmenden Blut herausnimmt. Drittens, und das scheint uns am wahrscheinlichsten, könnte durch rasche Diffusion in das Gewebe ein großer Teil des MH aus der Blutbahn entfernt werden. Es gelangt nur eine relativ kleine Menge der Substanz in das Herz, die nicht ausreicht, die sonst übliche inotrope Wirkung der Substanz in Gang zu bringen.

Insgesamt zeigt sich also, daß eine sichere, wenn auch schwache positiv inotrope Wirkung des MH nachgewiesen ist, welche für die

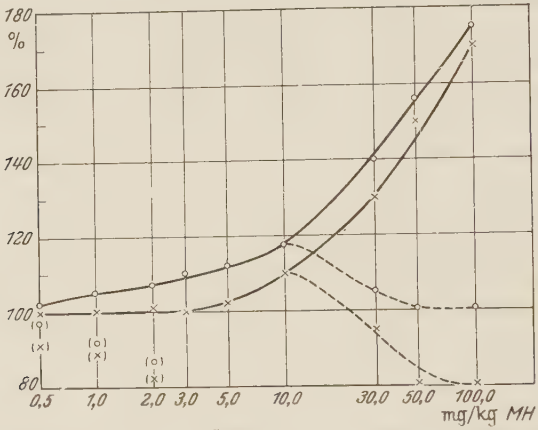


Abb. 1. Die Abhängigkeit der prozentualen Änderung des arteriellen Blutdruckes im großen Kreislauf von intravenös injiziertem MH in verschiedener Dosis. ——— die jeweils erreichten höchsten Druckwerte. - - - - - Druckwerte, auf die der Blutdruck bei Dosen von mehr als 10,0 mg/kg MH i.v. bei 50% der Tiere absinkt, nachdem er zuvor über die Ausgangslage angestiegen war. ( ) arterieller Druck im großen Kreislauf nach intraarterieller Injektion von MH

Blutdrucksteigerungen zum Teil verantwortlich ist. Neben diesem Inotropie-Effekt steigert auch der Frequenzanstieg den Blutdruck, doch finden sich Blutdrucksteigerungen auch bei sicher unveränderter Herzfrequenz. Da bei intraarteriellen Injektionen der Blutdruck vorwiegend absinkt, wird sich die Peripherie an der Drucksteigerung durch Vasoconstriction nicht unbedingt beteiligen, wenngleich wir natürlich Vasoconstrictionen in anderen als den von uns untersuchten Gefäßgebieten als Ursache einer Drucksteigerung bei intravenöser Applikation nicht ausschließen können. Die Frage, ob MH den zentralen Vasomotorentonus steigert, läßt sich aus den Versuchen mit Injektion in die A. carotis interna in etwa ablesen: keine dieser Injektionen hatte irgendeine Wirkung auf den Blutdruck oder die Durchblutung anderer Gefäßgebiete, obgleich die Dosen (0,03—0,2 mg/kg) bei intraarterieller Injektion in andere Gefäße (A. femoralis) im gleichen Versuch starke Wirkungen auslösten. Es ist also sehr unwahrscheinlich, daß die üblichen Dosen zentrale vasomotorische Effekte machen.

Wirkung auf den Vorhofdruck

Bei 3 Versuchen wurde der Druck im rechten Vorhof gemessen. Man sieht hier eine Abnahme der tiefsten Drucke auf 80% des Ausgangswertes, sowie ein Ansteigen der höchsten auf 110%. Die Zunahme des höchsten Vorhofdruckes ist entweder eine Folge des vermehrten venösen Rückstromes durch Eröffnung der Peripherie, oder es ist das Zeichen eines positiven Inotropieeffektes von MH auf den Vorhof. Die Abnahme des tiefsten Druckes kann wohl nur durch Zunahme der Herzkraft erklärt

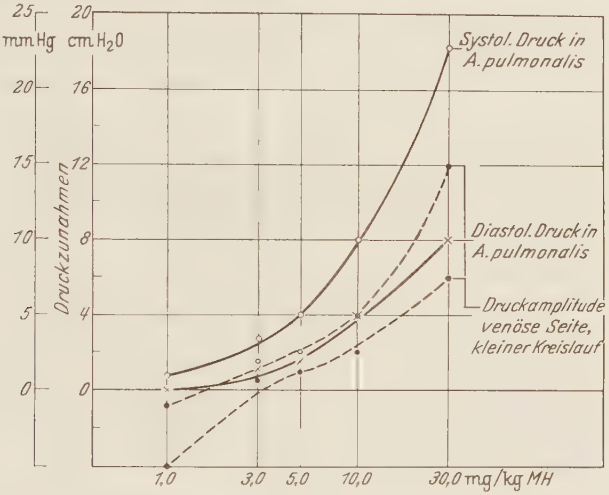


Abb. 2. Werte der Druckänderungen am arteriellen und venösen Schenkel des kleinen Kreislaufes nach i.v. MH-Injektionen. Die arteriellen Drucke steigen bei jeder getesteten Dosis an. Die venösen Drucke dagegen fallen bei 1,0 mg/kg i.v. ab und steigen erst bei höherer Dosierung an. ——— arterieller Druck - - - - - venöser Druck (Maxima und Minima desselben)

werden. Es kommt in der Systole zu einer rascheren und kräftigeren Abwärtsbewegung der Ventilebene und damit zum verstärkten Sog in den großen Venen und im Vorhof. Ein genaues Aufschlüsseln der einzelnen Vorhofdruckphasen war uns infolge unserer langsamen Registrierung nicht möglich.

Druck im kleinen Kreislauf

Der Druck im arteriellen Schenkel des kleinen Kreislaufes verhält sich ähnlich wie der im arteriellen Körperkreislauf. Er steigt bei intravenösen Injektionen von 1,0—3,0 mg/kg MH systolisch stärker an als diastolisch. Es vergrößert sich also auch hier die Blutdruckamplitude (Abb. 2). Infolge der geringeren Ausgangshöhe der Drucke im kleinen Kreislauf steigt der Blutdruck prozentual stärker an als im großen. Der absolute Anstieg ist hier jedoch geringer.

Der venöse Druck im kleinen Kreislauf wird durch MH weniger kompliziert als im großen Kreislauf verändert. Er hängt hier ja nur von einem

einheitlich reagierenden Gefäßgebiet und von der Herztätigkeit ab. Es reagierten jedoch nicht alle Tiere in der gleichen Weise. Intravenöse Injektionen von 0,1 mg/kg führten zum Absinken des Venendruckes. Injektionen von 0,3—30,0 mg/kg i.v. bedingen, daß der Venendruck sowohl mit dem höchsten als auch mit dem niedrigsten Wert ansteigt. Bei 3 von insgesamt 5 Hunden erfolgte jedoch auch in diesem Dosisbereich vor dem Druckanstieg eine Drucksenkung wie bei niedriger Dosierung, von etwa 1 min Dauer. Die zweiphasige Wirkung von MH bei diesen Tieren ist wohl so zu erklären, daß für den primären Abfall des Venendruckes eine Steigerung der Herzkraft des linken Ventrikels verantwortlich ist. Später werden dann die Lungengefäße durch MH erweitert und der vermehrte Blutrückstrom führt zum Anstieg des venösen Druckes im Lungenkreislauf. — Daß für den Druckabfall in der Tat die Herzkraft verantwortlich ist, zeigt folgender Versuch: Wird MH einmal in die V. brachialis, ein anderes Mal in die V. pulmonalis injiziert, so fällt der Druck im zweiten Fall, wo das Mittel direkt über die Herzkranzgefäße in das Herz gelangt, ohne daß dabei irgendwelche Gefäßgebiete dazwischengeschaltet sind, doppelt so stark ab wie im ersten Fall.

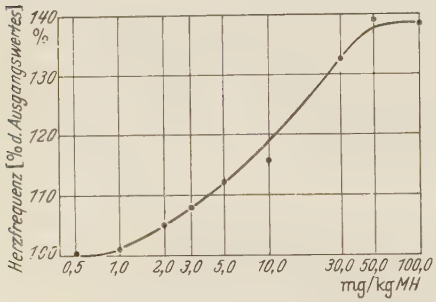


Abb. 3. Dosiswirkungskurve der Herzfrequenz nach intravenösen MH-Injektionen

Die Wirkung auf die Herzfrequenz

Die Herzfrequenz wurde bei fast allen Versuchen registriert. 0,5 mg/kg MH i.v. sind im allgemeinen unwirksam. Von 1,0 mg/kg MH i.v. aufwärts steigt die Herzfrequenz mit vergrößerter Dosierung zunehmend an, bis die Frequenzzunahme bei 50,0 mg/kg i.v. mit 140% der Ausgangsfrequenz ihr Maximum erreicht hat (Abb. 3). Die Frequenzwirkung von MH beginnt bei Dosierungen von mehr als 30,0 mg/kg i.v., genau wie beim Blutdruck, biphasisch zu werden. Auch hier reagieren 50% der Tiere nicht mehr nur mit einer Frequenzsteigerung, sondern mit einer — z. T. erheblichen — Bradykardie während der ersten 20—90 sec nach Injektionsbeginn. Während dieser Zeit steigt auch der Blutdruck sehr rasch an und die Gefäße der Peripherie sind konstringiert. Wenn dann die Gefäßwirkung umschlägt und die für hohe Dosen charakteristische Mehrdurchblutung einsetzt, der Blutdruck abfällt, beginnt das Herz schneller zu schlagen. Dies ist wohl ein Pressoreceptorenreflex.

Bei 10,0 mg/kg kommt es vereinzelt zu Extrasystolen. Bemerkenswert ist, daß die Herzen mit ihrer Frequenz verschieden stark auf MH ansprechen. Der Hauptgrund für die Frequenzwirkung liegt wahrscheinlich in einer direkten Beeinflussung des vegetativen Nervensystems. Wir ziehen diesen Schluß aus der Tatsache, daß bei Injektionen von MH in die A. coronaria der arterielle Blutdruck ansteigt, ohne daß es zu einer Änderung der Herzfrequenz kommt.

Die Wirkung von MH auf die verschiedenen peripheren Gefäße

Bei allen untersuchten Gefäßgebieten injizierten wir sowohl intravenös als auch, um druckpassive Reaktionen auszuschließen, intraarteriell. An 15 Tieren wurden 86 Injektionen in die Arteria femoralis

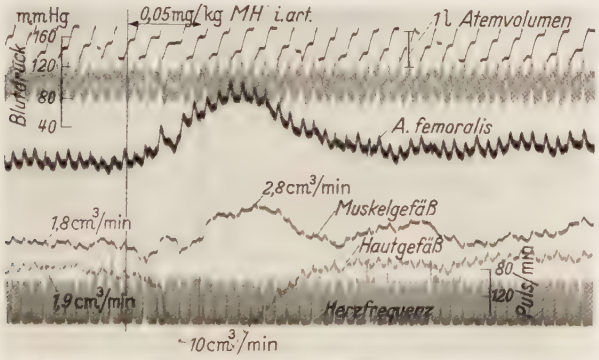


Abb. 4. Typisches Bild einer intraarteriellen MH-Injektion. Die Durchblutung im Muskel nimmt zu während die Haut weniger durchblutet wird. Die Zahlen in cm³/min beziehen sich auf Eichungen, welche an den bezeichneten Punkten vorgenommen wurden

ausgeführt und dabei Haut-, Muskel- und Gesamtdurchblutung registriert.

Extremitätengefäße. Die Reaktion auf intraarterielle MH-Injektionen in die A. femoralis ähnelt unverkennbar der Adrenalinwirkung (Abb. 4). Die Gefäße der Haut reagieren auch hier außerordentlich gleichartig, allerdings biphasisch. Bei niedriger Dosierung 0,005–0,2 mg/kg MH intraarteriell treten nur Abnahmen der Durchblutung auf, bis zu 50% des Ausgangswertes. Von 0,3 mg/kg MH intraarteriell reagiert die Haut vereinzelt mit einer Eröffnung der Strombahn. Bei einer Dosis von mehr als 5,0 mg/kg fanden wir nur noch Mehrdurchblutungen.

Die *Muskelgefäße* reagieren im Dosisbereich von 0,005–1,0 mg/kg MH intraarteriell in den verschiedenen Dosisbereichen bei 70–80% der Injektionen mit Durchblutungszunahmen, die 170% der Ausgangsdurchblutung erreichen können. Vereinzelt gab es jedoch auch Abnahmen der Durchblutung und in 15% der Fälle keine Reaktion. Oberhalb von 1,0 mg/kg MH intraarteriell sahen wir immer Mehrdurchblutungen.

Die Gesamtdurchblutung der hinteren Extremitäten nimmt als Summendurchblutung im Bereich von 0,03—0,2 mg/kg MH intraarteriell meist ab, bei höherer Dosierung zu. Abb. 5 zeigt eine Übersicht über die Reaktionsweise von MH bei den verschiedenen Gefäßen der hinteren Extremität des Hundes bei verschiedener Dosierung.

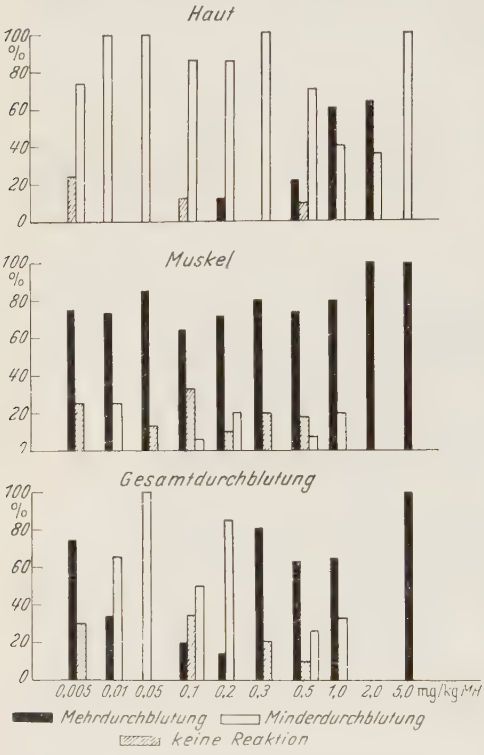


Abb. 5. Prozentuale Verteilung der verschiedenartigen Reaktionen nach MH bei den Gefäßen der hinteren Extremität. In der Haut schlägt die Wirkung bei zunehmender Dosierung von Gefäßkonstriktion in Gefäßdilatation um, während im Muskel bereits bei niedriger Dosierung Mehrdurchblutungen vorherrschen

Bei intravenösen Injektionen reagieren die Gefäße prinzipiell gleich, nur daß bei sehr hohen Dosen (mehr als 10 mg/kg MH i.v.) vor der langanhaltenden Mehrdurchblutung einige Sekunden die Durchblutung gedrosselt wird. Es handelt sich dabei möglicherweise um einen Reflex. Wir haben bei der Herzfrequenz bereits die Rolle einer Reizung des Sympathicus diskutiert, wodurch auch in diesem Falle die primäreMinderdurchblutung erklärt werden könnte, die dann sekundär durch peripheren Angriff der Substanz überlagert wird.

Wirkung auf die A. renalis und die Diurese. Unterschiedlich ist die Reaktion der Nierengefäße auf MH, die wir an 8 Hunden prüften. Die Nierengefäße reagieren bei intraarterieller Injektion vorwiegend mit Konstriktion. Bei intravenösen Injektionen von MH beobachteten wir bei 21 Reaktionen 12mal eine Mehrdurchblutung, die allerdings von Drucksteigerungen begleitet waren, siebenmal eine Minderdurchblutung trotz Druckanstieges. Die an den Extremitätengefäßen wirksame Dosis von 1,0 mg/kg i.v. war bei 14 von 21 Injektionen wirkungslos. Die Reaktionsweise schwankt jedoch von Tier zu Tier und auch bei dem gleichen Tier im Verlaufe eines Versuches außerordentlich. Im allgemeinen reagiert das Nierengefäß also mit Gefäßkonstriktionen, was die intraarteriellen Injektionen und die intravenösen Injektionen, bei denen trotz

Druckanstieges die Durchblutung gleich bleibt oder sogar abnimmt, beweisen. Die diuretische Wirkung von MH, die auch wir beobachteten, ist sicher kein Effekt durch direkten Angriff der Substanz am harnausscheidenden Apparat. Sie bleibt nämlich bei intraarteriellen Injektionen aus. Bei intravenösen Injektionen kann es trotz Minderdurchblutung zur verstärkten Diurese kommen, wenn der arterielle Blutdruck nach der Injektion ansteigt.

Wirkung auf die Durchblutung der A. coronaria. Bei 5 Hunden wurde die Durchblutung des linken Herzkranzgefäßes gemessen. Die Beurteilung der reinen Dilatationswirkung von MH ist am Herzkranzgefäß schwieriger, da bei fast allen Reaktionen, wo MH in die A. coronaria gespritzt wurde, gleichzeitig mit der Zunahme der Durchblutung auch eine Druckzunahme erfolgte. Um Irrtümer durch druckpassive Reaktionen weitgehend auszuschalten, wurde nach der Wezlerschen Kreislaufformel $i \backsim P^x$ die maximal zu erwartende druckpassive Mehrdurchblutung errechnet, wobei als x der hohe Exponent 3 eingesetzt wurde. Die errechneten Werte liegen bis auf einen unter den Durchblutungszunahmen, die im Experiment ermittelt wurden. Intravenöse Injektionen erzeugten ab 1,0 mg/kg MH Mehrdurchblutungen, deren Maximum bei einer Dosierung von 5,0 mg/kg lag. Es ist auffällig, daß die Reaktionen in den Coronargefäßen etwa doppelt bis dreifach so lange anhalten, wie in den Gefäßen der Peripherie. Das ist eine Eigenschaft, die wir allerdings auch bei anderen Wirkstoffen feststellten. Eine Abnahme der Durchblutung sahen wir im Herzkranzgefäß nie.

Wir wissen allerdings nicht, ob die Zunahme des coronaren Stromvolumens nach MH-Injektion durch ein primäres Angreifen der Substanz am Gefäß zustande kommt, oder ob sie sekundär durch Stoffwechselsteigerung hervorgerufen wird, da ja nicht nur die Durchblutung, sondern auch die Herzarbeit zunimmt.

Die Wirkung von MH auf die Lungengefäße. Die Wirkung auf die Lungengefäße wurde bei 6 Tieren untersucht (Abb. 6). Zur Registrierung verwendeten wir Gefäße mit einer Ausgangsdurchblutung von etwa 20,0 cm³/min. 0,1—1,0 mg/kg MH intraarteriell injiziert führte fast immer zu einer Mehrdurchblutung von maximal 30%. Intravenöse Injektionen von 1,0—30,0 mg/kg MH vergrößerten ebenfalls die Durchblutung. Die Gefäßreaktionen laufen in Arterie und Vene gleichsinnig. Es ist keine Speicherung oder Entspeicherung von Blut in der Lunge zu erkennen.

Wirkung auf die A. carotis interna und die A. mesenterica sup. An 3 Hunden wurde die Durchblutung der A. carot. int. mit 30 Injektionen untersucht. Dosen von 0,03 mg/kg — 0,2 mg/kg intraarteriell hatten keine Wirkung auf die Durchblutung des Gefäßes. An 4 Hunden wurde mit 25 Injektionen im Dosisbereich von 0,1—0,5 mg/kg MH

intraarteriell die Wirkung auf die Durchblutung der A. mesent. sup. geprüft. In keinem Falle zeigte das Gefäß eine veränderte Durchblutung. Bei Injektionen von 1,0—10,0 mg/kg MH i.v. beobachteten wir in beiden Gefäßen nur druckpassive Durchblutungsänderungen.

Wirkung von MH auf die Atmung und Sauerstoffaufnahme

Bereits bei den ersten Versuchen fiel auf, daß die atemsynchronen Blutdruckschwankungen, die am narkotisierten Hund als Ausdruck einer durch das Narkosemittel zentral gestörten Atemtätigkeit normalerweise sehr unregelmäßig in ihrer Frequenz und Amplitude sind,

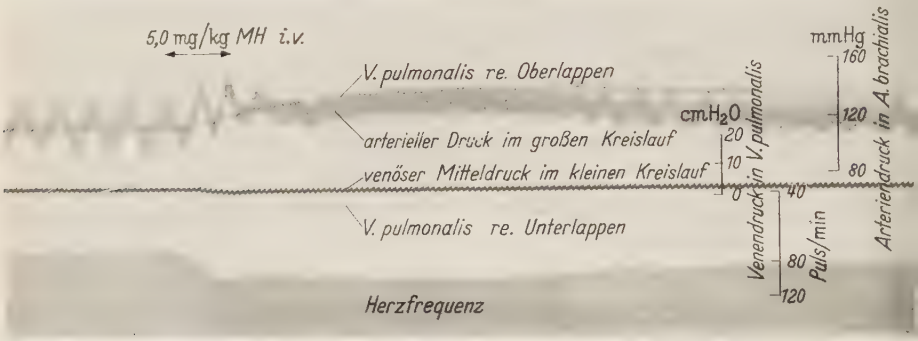


Abb. 6. Die Wirkung von intravenöser MH-Injektion. Die Durchblutung der registrierten Lungenvenen nimmt zu. Die arteriellen Blutdruckschwankungen, die ein Zeichen des schlechten Kreislaufzustandes sind, verschwinden nach MH-Injektion unter gleichzeitigem Druckanstieg. Die Herzfrequenz nimmt zu. Der Venendruck sinkt noch eben merkbar ab

durch MH in Dosen von 1.0 mg/kg i.v. weitgehend regularisiert wurden (Abb. 6). Wir registrierten deshalb bei 5 Hunden das Atemvolumen; konnten bei 4 Tieren jedoch in keinem Dosisbereich eine Änderung des Atemminutenvolumens finden. Die Atmung wurde hier also nur qualitativ, nicht quantitativ verändert. Ein Tier zeigte eine Zunahme des Atemvolumens von durchschnittlich 0,9 l/min bei einer Ausgangslage von 3.6 l/min. Es mag dies vielleicht der Ausdruck einer auch von anderen Autoren beschriebenen analeptischen Wirkung von MH sein.

Ziemlich regelmäßig kam es jedoch zu einer Änderung der Sauerstoffaufnahme bei der Atmung. Die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs pro Minute ergibt, daß der Sauerstoffumsatz nach Gaben von 1,0 bis 3,0 mg/kg MH i.v. bis zu 20% gesteigert ist. Bei höherer Dosierung sinkt die Sauerstoffaufnahme ab. Diese Verstärkung des Umsatzes ist jedoch nicht unmittelbar dafür beweisend, daß MH zu einer echten Gesamt-Umsatzsteigerung führt. Es handelt sich möglicherweise um ein Speicherphänomen, da die Wirkung nur 3—5 min anhält, in dieser Zeit die starken Änderungen der Stromvolumina liegen und also Sauerstoff verstärkt ins Gewebe abgewandert sein kann.

Wirkung von MH auf den Histaminkollaps

Bei 2 Hunden wurden durch Histamingaben von 2,0 mg/kg i.v. kräftige aber spontan reversible Kollapse gesetzt, die durch Noradrenalin und Sympatol kupiert werden konnten. Der Blutdruck fällt nach der Injektion in wenigen Sekunden auf einen Minimalwert ab und kehrt dann innerhalb von 10—15 min fast geradlinig zu seiner Ausgangshöhe zurück. Der Tangens des Anstiegswinkels der Blutdruckkurve gibt eine brauchbare Vergleichsgröße über die Restitution nach gesetztem Kollaps.

Das MH wurde in steigenden Dosen als einmalige Injektion nach Beginn des Blutdruckanstieges im Histaminkollaps intravenös gegeben. Nach kleinen MH-dosen (1,0 mg/kg i.v.) sahen wir, daß der Kollaps ein wenig schneller überwunden wurde. Es kann jedoch von einer Kupierung wie nach Sympatol oder Noradrenalin nicht die Rede sein. Bei höherer Dosierung steigt die Blutdruckkurve langsamer an und die Tachykardie wird verstärkt. Es wirkt hier das MH also ungünstig auf die Restitution nach Kollapsen.

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Steilheit des Anstieges der Blutdruckkurve nach gesetztem Histaminkollaps. (Mittelwerte der beiden Versuchsreihen.)

tg des Anstiegswinkels der Blutdruckkurve bei Restitution des Histaminkollapses.

2,0 mg/kg Histamin i.v.	tg = 0,10
2,0 mg/kg Histamin i.v., danach 1,0 mg/kg MH	tg = 0,15
2,0 mg/kg Histamin i.v., danach 5,0 mg/kg MH	tg = 0,075
2,0 mg/kg Histamin i.v., danach 10,0 mg/kg MH	tg = 0,06

Bei einem weiteren Versuch wurde Histamin in die A. saphena, ein reines Hautgefäß injiziert, da zu hoffen war, daß Kollapsformen, die sich allein auf die Haut beschränken, durch MH günstig beeinflußt werden könnten. Auch hier war kein therapeutisch brauchbarer Effekt zu erzielen.

Interferenz von MH mit Adrenalin und Theophyllin

Wird bei maximaler MH-Dilatation Adrenalin zusätzlich gespritzt, so kommt es bei höherer Adrenalindosierung zur gewohnten Konstriktion aller Gefäße. Wird MH mit 7-Dioxypropyltheophyllin Fa. Knoll zu gleichen Teilen kombiniert, so tritt eine additive Wirkung am peripheren Gefäß ein. Beide Substanzen allein haben etwa die gleichstarke Wirkung am Gefäß. Durch die Kombination konnten wir aber auch dann volle Wirkung erzielen, wenn eine der beiden Substanzen allein versagte.

Toxicität und Tachyphylaxie

Ganz allgemein ist zu sagen, daß die Wirkung des MH am Hund großen Schwankungen unterworfen ist, während die zur Testung der Reaktionslage immer mitgeschriebenen Adrenalin- und Noradrenalininjektionen im allgemeinen bei allen Tieren gleichmäßig beantwortet wurden. Sind normalerweise erst Dosen von 1,0 mg/kg MH i.v. wirksam, so reagierte ein Tier schon bei 0,05 mg/kg MH i.v. mit deutlicher Blutdruckzunahme und Tachykardie. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Dosis letalis. Es wurden von allen Tieren mehrmalige Injektionen von 100,0 mg/kg MH i.v. in Abständen von 15 -30 min vertragen, doch kam ein Tier bereits bei 50 mg/kg i.v. durch Herzversagen ad exitum. Die Herzfrequenz sank rasch unter 40 Pulsschläge pro Minute und der Blutdurck auf wenige Millimeter Quecksilber ab.

Wir prüften die Toxicität außerdem an weißen Mäusen und fanden eine LD 50 von 1250 mg/kg MH intraperitoneal injiziert. Die Tiere gingen im Verlauf von 15—50 min unter klonischen Krämpfen zugrunde. In der weiteren Beobachtungszeit von 24 Std ging kein weiteres Tier ein.

Besprechung der Ergebnisse

Im MH haben wir eine relativ wenig toxische Substanz vor uns, die im Tierexperiment offensichtlich an den drei für den Kreislauf entscheidend wichtigen Organen angreift, nämlich am Herzen, am peripheren Gefäß und an der Niere. Die positiv inotrope Wirkung an der isolierten Herzfaser konnte Loubatieres exakt ermitteln. Unsere Versuche am Ganztier beweisen, daß auch hier die Herzkraft nach MH gesteigert wird. Besondere Beweiskraft haben die intraarteriellen Injektionen in die Coronararterien von MH in einer Konzentration, die sicher nur lokal wirksam ist. Die hierbei auftretende Blutdrucksteigerung bei unveränderter Herzfrequenz kann nur durch gesteigerte Förderleistung des Herzens erklärt werden. Es ist dabei allerdings nicht entschieden, ob diese Wirkung durch einen direkten Angriff der Substanz an der Herzmuskelfaser, oder indirekt durch die Verbesserung der Coronargefäßdurchblutung zustande kommt, — eine Frage, die bei allen ähnlich wirkenden inotropen Substanzen außer den Digitalisstoffen offensteht. Auch die Durchblutung der Lungengefäße weist auf die positiv-inotrope Wirkung von MH hin. Da Lungenvenen und -arterien nach MH-Injektionen etwa gleich stark mehrdurchblutet werden, muß das Minutenvolumen des Herzens ansteigen. Es steigt aber gleichzeitig auch der arterielle Druck im großen und kleinen Kreislauf. Das Nebeneinander dieser beiden Phänomene kann nur durch ein Anwachsen der Herzkraft erklärt werden.

Es erhebt sich nun die Frage, ob MH einen Vorzug vor anderen positiv-inotrop wirkenden Substanzen besitzt. Vorteilhaft ist sicher, daß MH leicht wasserlöslich

ist und sofort seine Wirkung entfaltet. Zur klinischen Erprobung reizen die Kombination von positiv-inotroper Wirkung mit Gefäßerweiterung im Coronargebiet. Barre stellte fest, daß an der isolierten Herzmuskelfaser die Digitaliswirkung durch MH erheblich gesteigert wird.

Kontraindikation ist der Kollaps, bei dem MH von Loubatieres, Huggins u. Handly empfohlen wird. Es gelingt zwar, in einem schmalen, allerdings nicht vorauszusehenden Dosisbereich den Kollaps etwas zu bessern, jedoch nicht so stark, wie das mit anderen bekannten Kollapsmitteln möglich ist. Außerhalb dieses Dosisbereiches jedoch wird der Kollaps verstärkt, da die peripher dilatierende Wirkung die Oberhand gewinnt.

Zusammenfassung

Es wird über Hundeversuche mit 2-Methyl-2-Hydroxy-6-Aminoheptan = MH berichtet und es werden folgende Befunde erhoben:

1. Der arterielle Blutdruck steigt nach intravenösen MH-Injektionen sowohl im großen, wie im kleinen Kreislauf an. Der Venendruck verhält sich in beiden Kreisläufen individuell verschieden. Bei 1,0 mg/kg MH i.v. sinkt der Venendruck im kleinen Kreislauf.

2. Die Herzkraft wird durch MH erhöht, die Herzfrequenz nimmt zu.

3. Die verschiedenen peripheren Gefäße reagieren unterschiedlich.

a) Die Coronar-Lungen- und Muskelgefäße werden bei i.a. Injektion stärker durchblutet.

b) Die Gefäße der Haut in der hinteren Extremität reagieren bei einer Dosierung von 0,005—0,3 mg kg MH intraarteriell in die A. fem. immer mit Abnahme der Durchblutung. Bei höherer Dosierung werden Mehrdurchblutungen beobachtet, die von 5,0 mg/kg aufwärts ausschließlich auftreten.

c) Die A. renalis zeigt unterschiedliche Reaktion, auch bei gleicher Dosierung und am gleichen Tier im Laufe eines Versuches. Bei intravenösen Injektionen herrschen Mehrdurchblutungen vor.

d) In der A. carotis int. und A. mesenterica sup. wurden keine Reaktionen beobachtet.

4. Die Atmung wird bei einem Teil der Tiere angeregt. Fast immer führen Dosen von 1,0—3,0 mg/kg MH i.v. zu einer kurzdauernden Mehraufnahme von Sauerstoff bei der Atmung.

5. Der Histaminkollaps wird nur in einem schmalen Dosisbereich geringfügig gebessert.

6. Die Diurese wird nach intravenösen MH-Injektionen angeregt, nicht bei intraarteriellen.

7. Die Kombination von MH mit 7-Dioxypropyltheophyllin wirkt additiv und sicherer als Injektionen der Einzelsubstanzen.

8. Die LD 50 an der Maus beträgt intraperitoneal 1,25 g/kg.

Literatur

Barre, J.: Soc. Belg. de Biologia **149**, 202 (1955). — Behrens, B., u. G. Kärber: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **177**, 379 (1935). — Charlier, R.: Arch. internat. pharmacodynamie **85**, 144 (1951). — Garrett, J.: Arch. internat. pharmacodynamie **100**, 17 (1954). — Gottsein, U., H. Hille u. A. Oberdorf: Pflügers Arch. **261**, 78 (1955). — Giraut, G., A. Loubatieres et H. Latour: Montp. med. **37—38**, 227 (1950). — Presse. méd. **1950**, 1165. — Goldberg, L., V. Cotton, Th. Darby and E. Howell: J. Pharmacol a. Exper. Ther. **108**, 177 (1953). — Hille, H., H. Schaefer, H. J. Teske u. K. E. Zipf: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **227**, 281 (1955). — Huggins, R. H., C. A. Handly and M. Forge: Amer. J. Physiol. **157**, 352 (1949). — Jackson: Anaesthesiology **27**, 61 (1948). — Loubatieres, A.: Arch. internat. Pharmacodynamie **85**, 333 (1951). — Montp. med. **44**, 362 (1953). — C. r. Soc. Biol. (Paris) **143**, 85 (1949). — Loubatieres A., et P. Bouyard: J. de Physiol. **42**, 640 (1950); **46**, 44 (1954). — Schaefer, H., E. Bleicher u. F. Eckervogt: Pflügers Arch. **251**, 491 (1949). — Walton, A., and J. Brodie: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 343 (1949). — Wezler, K., u. W. Sinn: Das Strömungsgesetz des Blutkreislaufs. Aulendorf 1953.

Dr. H. Hille, Würzburg, Universitäts-Kinderklinik

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230. S. 155—160 (1957)

Aus dem Institut de Médicine et de Chirurgie expérimentales
Université de Montréal, Montreal, Canada
(Direktor: Prof. Dr. H. Selye)

Über die humorale Beeinflussung des experimentellen Lathyrismus

Von
Hans Selye

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 20. November 1956)

Es ist schon seit langem bekannt, daß Menschen oder Tiere, die große Mengen der Samen von Lathyrus odoratus (Gartenwicke oder spanische Wicke) essen, eine merkwürdige Krankheit entwickeln, die mit dem Namen Lathyrismus bezeichnet wurde. Diese Krankheit ist besonders durch Skeletveränderungen gekennzeichnet, die mit einer starken Reorganisation der Knochenstruktur und der Ausbildung von multiplen Exostosen, besonders an den Insertionen von Sehnen und Muskeln, einhergehen. Vor kurzem konnte nun festgestellt werden, daß gewisse Nitrile in den Samen von Lathyrus für diese Veränderungen verantwortlich sind und daß man insbesondere mit Verfütterung oder subcutanen Injektionen von Aminoacetonitril (AAN) leicht einen experimentellen Lathyrismus bei der Ratte hervorrufen kann. Diese Krankheit interessierte uns hauptsächlich deshalb, weil sie durch verschiedene Stressoren (die eine Nebennierenrindenhyperplasie hervorrufen) ebenso wie auch durch parenterale Administration von Glucocorticoiden verhindert, durch das somatotrophe Hormon (STH) hingegen verstärkt wird[4–7].

Über die Entgiftung von AAN im Organismus ist bisher nichts bekannt. Es konnte jedoch festgestellt werden, daß Ratten die lange mit kleinen Dosen von AAN behandelt wurden, schließlich eine Toleranz auch gegen größere Dosen dieses Stoffes erwerben[3].

Da die Leber bei so vielen biologischen Entgiftungsprozessen eine wichtige Rolle spielt, wollten wir nun feststellen, ob die Toleranz gegen AAN durch eine experimentelle Leberinsuffizienz vermindert werden kann. Vor 25 Jahren haben wir in diesem Archiv[8] eine Technik für die experimentelle Erzeugung einer Leberinsuffizienz durch partielle Hepatektomie bei kleinen Nagetieren beschrieben. Dieses Verfahren wandten wir nun zum Studium der möglichen Beteiligung der Leber bei der AAN-Intoxikation an. Gleichzeitig stellten wir uns auch die Aufgabe,

den Einfluß von ACTH und von Thyroxin — zweier bisher noch nicht in dieser Hinsicht untersuchter Hormone — auf die durch das AAN hervorgerufenen Knochenveränderungen zu untersuchen. Dies sollte uns zeigen, ob auch die endogenen Corticoide, die unter dem Einfluß von ACTH sezerniert werden, und das Schilddrüsenhormon, das ja bekanntermaßen auf die Entwicklung des gesamten Organismus einen starken Einfluß hat, den Ablauf des Knochenlathyrismus beeinflussen könnten.

Material und Methodik

60 weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem durchschnittlichen Anfangsgewicht von 100 g (95—110 g) wurden in 6 gleiche Gruppen geteilt. Alle Tiere bekamen während der ersten 11 Versuchstage 2mal täglich 5 mg AAN (in Form von Aminoazetonitrilhydrosulfat) in 0,2 cm³ Wasser subcutan injiziert. Da zu dieser Zeit manche der hepatektomierten Tiere offensichtlich schon schwer krank waren, wurden die AAN-Injektionen in allen Gruppen während zweier Tage unterbrochen. Am 13. Tag, als die Ratten sich wieder erholt hatten, gaben wir wieder dieselbe Menge AAN täglich bis zum 18. Tag. Am 21. Tag wurden die Tiere aller Gruppen getötet. Während der letzten 3 Tage gaben wir deshalb kein AAN, weil uns frühere Versuche gelehrt hatten, daß die starken periostalen Knochenneubildungen während der Behandlung nur sehr schwach verkalkten und daß folglich eine genaue Messung des Knochens unmöglich ist, da man das weiche Knochengewebe von den umgebenden Muskeln nicht gut freipräparieren kann. Eine Ruheperiode von 3 Tagen genügt jedoch, um eine Konsolidierung und Verkalkung des neugebildeten Knochengewebes zu ermöglichen.

Während somit alle Tiere die gleiche Menge von AAN erhielten, wurden die 6 Gruppen außerdem noch folglich behandelt:

Gruppe 1 Kontrollen ohne andere Behandlung.

Gruppe 2 Thyreoparathyreoidektomie unter Äthernarkose.

Gruppe 3 Thyreoparathyreoidektomie wie in Gruppe 2 aber gleichzeitig wird 1 μg Natrium-l-thyroxinat (British Drug Houses Limited) in 0,2 cm³ Wasser subcutan täglich injiziert um eine Substitutionstherapie ohne zu starke Überdosierung anzuwenden.

Gruppe 4 bekam 500 μg des oben genannten Thyroxinpräparates ebenfalls in 0,2 cm³ Wasser täglich subcutan injiziert, um eine starke Überdosierung von Schilddrüsenhormon zu erzeugen.

Gruppe 5 wurde am 1. Versuchstage partiell hepatektomiert mittels einer leichten Modifikation der schon früher erwähnten Methodik[8]. In Äthernarkose wird nach Rasieren der Bauchhaut ein Längsschnitt vom Processus xiphoideus aus, etwa 2,5 cm caudalwärts in der Mittellinie durch die Haut geführt. Dann wird dort in der Linea alba die Bauchmuskulatur durch einen Schnitt durchtrennt. Durch leichten seitlichen Druck auf die untere Thoraxapertur werden nun die 2 vorderen größten Leberlappen (Lobus medianus und Lobus lateralis sinister) vorgelagert und an ihrem Hilus abgebunden. Bei ihrer Abtrennung kommt es zu keinerlei Blutverlust. Hierauf wird die Muskelschicht und dann die Haut mit je einer fortlaufenden Naht verschlossen, Nach Vollendung des Eingriffes werden die Tiere bald wieder munter und laufen herum. Der gesamte Eingriff nimmt etwa 5 min in Anspruch und wurde von allen Tieren glatt vertragen. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß durch diese Operation etwa 70% des gesamten Lebergewebes ausgeschaltet wird. Es bleiben hierbei nur 4 kleinere Leberläppchen zurück (2 im rechten

Hypochondrium sowie einer vor und einer hinter der Cardia), aber diese regenerieren ziemlich rasch. Funktionsprüfungen hatten uns gezeigt, daß gewöhnlich nach 1 Woche die Leberfunktion sich wieder normalisiert[2], daher haben wir am 5. Versuchstag eine 2. Operation ausgeführt, bei der unter Äthernarkose durch denselben Bauchschnitt die 2 zurückbleibenden Leberläppchen im rechten Hypochondrium (Lobus lateralis dexter und Lobus caudatus) nach Unterbindung am Hilus abgetragen wurden.

Gruppe 6 bekam 5 I.E. ACTH (Duracton, Nordic Biochemicals) in je 0,1 cm³ Sesamöl 2mal täglich subcutan injiziert.

Die gesamte Versuchsanordnung ist in Tab. 1 zusammen mit den wesentlichsten Beobachtungsergebnissen übersichtlich dargestellt. In dieser Tabelle wurde die durchschnittliche Intensität des Skeletlathyrismus in verschiedener Weise angegeben. Die Deformation der Rippen haben wir bloß beiläufig im Sinne einer Skala von 0—3 makroskopisch beurteilt und in der Tabelle durch den Mittelwert für jede Gruppe angedeutet. Der Femur hingegen wurde als ein Beispiel eines genau meßbaren Röhrenknochens von den umgebenden Muskeln sorgfältig befreit und, nach kurzer Härtung in Susaflüssigkeit, seine Länge, sowie sein kleinster Durchmesser, mit Hilfe eines Tasterzirkels genau bestimmt. Von jedem Knochen wurden außerdem nach kompletter Entkalkung in Susaflüssigkeit und Einbettung in Paraffin 2 mit PAS-Technik gefärbte histologische Schnitte angefertigt: Einer in sagittalem Sinne längs durch die Ephiphysenknorpelregion und der zweite quer durch die vorher gemessene engste Stelle des Schaftes. Es sei nebenbei bemerkt, daß eine zweite am histologischen Präparat mit einem Zirkel gemachte Messung des Durchmessers mit den Messungen am intakten Knochen gut übereinstimmte.

Außerdem führen wir auch in der Tabelle das mittlere Körpergewicht zu

Tabelle 1. *Humorale Beeinflussung des experimentellen Lathyrismus*

Gruppe	Behandlung*	Körpergewicht bei Versuchsende gr	Thymus mg	Nebennieren mg	Femur			Deformation der Rippen
					mg	Länge cm	Durchmesser cm	
1	—	140 ± 5,3	251 ± 18,0	38,9 ± 1,9	835 ± 29,1	2,8 ± 0,03	0,5 ± 0,03	1,0
2	Thyreoparathyreoidektomie	107 ± 4,5	155 ± 15,6	30,7 ± 2,1	798 ± 58,3	2,5 ± 0,02	0,6 ± 0,02	1.4
3	Thyreoparathyreoidektomie + Thyroxin (1 μg)	114 ± 5,4	135 ± 20,1	32,7 ± 1,5	864 ± 27,7	2,6 ± 0,03	0,6 ± 0,02	1,6
4	Thyroxin (500 μg)	132 ± 3,2	145 ± 13,6	43,1 ± 1,7	403 ± 17,1	2,9 ± 0,02	0,3 ± 0	0
5	Partielle Hepatektomie	135 ± 3,4	126 ± 12,2	38,7 ± 1,8	1056 ± 70,2	2,5 ± 0,03	0,7 ± 0,03	2,1
6	ACTH (2 × 5 I.E.)	154 ± 3,6	54 ± 11,5	87,2 ± 3,6	566 ± 32,1	2,7 ± 0,03	0,4 ± 0,02	0,3

* Die Tiere aller sechs Gruppen bekamen zweimal täglich 5 mg Aminoazetonitril.

Versuchsende, sowie das mittlere Thymus- und Nebennierengewicht (mit ihren Standardfehlern) an, da diese Organgewichte dem Stresseffekt der verschiedenen Behandlungsarten im Vergleich mit der Wirkung des ACTH anzeigen können.

Versuchsergebnisse

Schon die makroskopische Betrachtung der Knochen bei der Autopsie zeigte, daß bei den nur mit AAN behandelten Kontrollen der *Gruppe 1* ein mittelmäßiger Lathyrismus mit Verdickung und Deformation des Femur

A *B* *C* *D*

Abb. 1. *A*. Nur mit AAN behandeltes Kontrolltier der Gruppe 1. Mäßiger Lathyrismus des Femur. *B*. Partiell hepatektomiertes, mit AAN behandeltes Tier der Gruppe 5. Sehr schwerer Lathyrismus, der die Struktur des Femur vollkommen verwischt. *C*. Mit ACTH und AAN behandeltes Tier der Gruppe 6. Die pathologische Knorpelwucherung (besonders an der unteren Femurepiphyse) und die Exostosenbildung (besonders an den Sehnenansätzen) sind im Vergleich zum Kontrolltier „A" etwas vermindert, aber nicht vollständig unterdrückt. *D*. Mit hohen Dosen Thyroxin und AAN behandeltes Tier der Gruppe 4. Hier ist überhaupt keine pathologische Veränderung am Femur zu bemerken

und der Rippen vorhanden war. Die meisten anderen Knochen waren ebenfalls deformiert, aber da wir diese nicht genau untersucht haben, wollen wir unsere Besprechung hier bloß auf die in der Tabelle angeführten Messungen beschränken.

Die einfach thyreoparathyreoidektomierten Ratten der *Gruppe 2* ebenso wie die nach Thyreoparathyreoidektomie mit täglich 1 μg Thyroxin behandelten Tiere der *Gruppe 3*, wiesen einen etwas stärkeren Knochenlathyrismus auf als die Kontrollen der *Gruppe 1*.

Das Skelet der mit 500 μg Thyroxin behandelten Ratten der *Gruppe 4* hingegen ließ sich nicht merklich von dem völlig unbehandelter Tiere gleichen Gewichtes in unserer Kolonie unterscheiden. Hier konnte man demnach von einem Lathyrismus überhaupt nicht sprechen.

Bei weitem die schwersten Knochendeformationen fanden wir bei den partiell hepatektomierten Tieren der *Gruppe 5*.

ACTH verminderte unter unseren Versuchsbedingungen in *Gruppe 6* den Knochenlathyrismus ausgesprochen aber doch unvollständig.

Bezüglich der anderen Messungen sei nur hervorgehoben, daß ACTH, in der hier angewandten Dosierung, eine sehr starke Nebennierenhypertrophie hervorrief. Dies ebenso wie die starke Thymusatrophie zeigt, daß es hier zu einer bedeutsamen Erhöhung der Glucocorticoidproduktion kam; trotzdem bewirkte das corticotrophe Hormon (ACTH) keinen starken Körpergewichtsverlust und nur eine partielle Hemmung der pathologischen Knochenveränderungen. Dies ist bemerkenswert, da Cortisol schon in relativ kleinen Mengen die durch AAN hervorrufbaren Knochenveränderungen vollständig verhindert[7].

Keine der anderen in diesen Versuchen angewendeten Behandlungsarten rief eine mit der ACTH-Wirkung vergleichbare Nebennierenhypertrophie oder Thymusatrophie hervor. Die typischen Femurveränderungen in den am stärksten durch unsere Behandlung beeinflußten Gruppen sind in Abb. 1 illustriert.

Diskussion

Aus diesen Beobachtungen wird es klar, daß man durch eine ausgedehnte und wiederholte Resektion von Lebergewebe die Empflindlichkeit der Knochen für AAN stark erhöhen kann. Dies beweist aber nicht endgültig, daß AAN normalerweise in der Leber entgiftet wird. Es ist ebenfalls möglich, daß nach Ausfall gewisser Leberfunktionen die Knochen selbst für AAN überempfindlich werden. Jedenfalls steht fest, daß die Leber auf die Ausbildung von Skeletlathyrismus einen starken Einfluß ausübt.

Die leichte Verstärkung der Knochenveränderungen durch Thyreoparathyreoidektomie und ihre vollständige Verhinderung durch hohe Dosen von Thyroxin sind ebenfalls von Interesse. In vielen Beziehungen sind Thyroxin und Glucocorticoide Antagonisten. So z. B. haben die letzteren ausgesprochene antiphlogistische, thymolytische und splenolytische Wirkungen während Thyroxin verschiedene entzündliche Reaktionen fördert, und die durch Glucocorticoide bewirkte Atrophie von Thymus und Milz weitgehend verhindern kann[1]. Merkwürdigerweise hemmt Cortisol (und wie aus den hier beschriebenen Untersuchungen zu ersehen ist auch ACTH) den Skeletlathyrismus, obwohl es sich hier nicht um eine typische entzündliche Reaktion handelt. In dieser letzten Beziehung jedoch ist Thyroxin in demselben Sinne wie die antiphlogistischen Hormone wirksam, indem es die pathologischen Gewebsreaktionen hemmt. Weitere Versuche werden uns zeigen müssen, wie weit die hier beschriebenen humoralen Faktoren auch andere experimentelle und

vielleicht sogar auch beim Menschen vorkommende Knochenveränderungen beeinflussen können.

Diese Versuche wurden teilweise durch die Gustavus und Louise Pfeiffer Research Foundation und teilweise durch die Warner-Chilcott Laboratories unterstützt. Das hier benützte ACTH (Duracton) wurde uns freundlicherweise von der Fa. Nordic Biochemicals zur Verfügung gestellt.

Summary

Experiments on albino rats indicate that various humoral agencies can markedly influence the manifestations of skeletal lathyrism that are normally produced by aminoacetonitrile (AAN).

Thyroparathyroidectomy moderately enhances the skeletal lathyrism thus produced. This effect is not significantly altered by mere maintenance doses of thyroxine, but intensive overdosage with this hormone totally prevents the bone changes normally elicited by AAN.

An amount of ACTH, that more than doubles the weight of the adrenals and causes pronouced thymus atrophy, also inhibits the effect of AAN, but fails to prevent it completely. This is all the more noteworthy because comparatively small doses of cortisol can totally prevent such bone lesions.

Extensive partial hepatectomy greatly increases the effect of AAN upon the bones.

Literatur

[1] Bois, P., and H. Selye: J. of Endocrin. (Im Druck). — [2] Selye, H.: Stress, Acta Inc., Publ. Montreal 1950. — [3] Selye, H.: Arch. internat. Pharmacodynamic (Im Druck). — [4] Selye, H., and P. Bois: Can. Physiol. Soc. Meet. Oct. 1956. — [5] Selye, H., and P. Bois: 24e Congress ACFAS, Montreal, Nov. 2—4. (1956). — [6] Selye, H., and P. Bois: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **94**, 133 (1957). — [7] Selye, H., and P. Bois: Endocrinology (Springfield, Ill.) (Im Druck). — [8] Waelsch, H., u. H. Selye: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **161**, 115 (1931).

Prof. Dr. Hans Selye,
Institut de Médicine et de Chirurgie experimentales Universite de Montreal,
Montreal/Canada, Case postale 6128

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 161—173 (1957)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg/Brg.
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. L. Heilmeyer)

Das Verhalten der Glykoproteide, Lipoproteide und Serumproteine unter entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Faktoren

Von
F. Wöhler und K. Ghiassi

(Eingegangen am 13. Dezember 1956)

Bei den verschiedensten Erkrankungen erfahren die Glykoproteide, die Lipoproteide und die Serumproteinfraktionen charakteristische Veränderungen. Eine Vermehrung der Glykoproteide ist besonders bei Entzündungen und Infektionskrankheiten wie bei fast allen Erkrankungen, die zu einem Gewebszerfall oder einer starken Beanspruchung des Eiweißstoffwechsels führen, sehr ausgeprägt. Dabei konnten Bergstermann u. Mitarb., Seibert u. Stary nachweisen, daß die Zunahme der Glykoproteide der Bösartigkeit des Prozesses parallel läuft. Ob die Mucopolysaccharide aus dem Krankheitsherd selbst stammen (Seibert, Knüchel u. Kienle u. a.) oder als unspezifische Schutz- und Abwehrmaßnahme des Organismus vermehrt gebildet werden (Bergstermann), ist noch weitgehend ungeklärt. Auch an eine Beziehung zum Kohlenhydratstoffwechsel wurde gedacht, nachdem von Mohnike u. Richter, Stary u. a. gezeigt werden konnte, daß bei Diabetikern eine Erhöhung der Glykoproteidwerte auftritt. Ähnlich den Veränderungen der Glykoproteide bei der Entzündung konnte Schrade in experimentellen Untersuchungen mit Pyrifer zeigen, daß auch die Lipoide des Blutes nach einer vorübergehenden Abnahme einen Anstieg erfuhren. Da andererseits bekanntlich unter dem entzündlichen Geschehen auch eine Verschiebung des Albumin-Globulin-Quotienten zugunsten der Globuline stattfindet, erschien es von Bedeutung, in tierexperimentellen Studien mittels der Papierelektrophorese etwa gesetzmäßige Veränderungen der Glyko- und Lipoproteide wie Serumproteine unter entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Faktoren zu untersuchen.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an 140 Meerschweinchen aus einem gesunden Inzuchtstamm mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von etwa 400 g durchgeführt. Die Versuchstiere erhielten vor und während der Versuchsdauer eine einheitliche Ernährung aus Körnern und Grünfutter.

Diphtherie-Toxin (Behring-Werke, Marburg) wurde in der Dosierung von 3mal ½ dlm pro Tier über 6 Tage verteilt s.c. injiziert. Als bakterieller Reizstoff kam ein Lipopolysaccharid aus Salmonella abortus equi-Keimen (Pyrexal, Fa. Wander, Bern) in der Dosis von 1 γ/kg Körpergewicht zur Anwendung. ACTH und Cortison (Schering, Berlin) wurden in der Dosis von 10, 20, 25, 50 und 100 mg pro Kilogramm einmalig i.p. und im Dauerversuch als Depot-ACTH und Cortison zu 50 mg/kg täglich 6 Tage lang i.m. appliziert. Cortison-Tabl. (Fa. Ciba, Wehr) kamen oral zu 50 mg pro Kilogramm täglich während 6 Tagen zur Verabreichung. Prednison (Decortin Fa. Merck, Darmstadt) und Prednisolon (Dacortin, Fa. Merck), injizierten wir nach Auflösung der Tablettenmenge, die der gewählten Dosis entsprach (50 mg/kg) intraperitoneal. Die Injektion von somatotropem Hormon (Lab. Chaully, Paris) erfolgte einmalig in der Stärke von 50 mg/kg i.p. Thyroxin (Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach) wurde einmalig in der Dosis von 1 mg/kg i.p. und im Gewöhnungsversuch über 7 Tage täglich in derselben Dosierung i.m. verabreicht. Cystein (Hormodyn forte, Fa. Nordmark, Hamburg) wurde einmalig in der Dosierung von 500 mg/kg i.p. und im Dauerversuch über 7 Tage in der Stärke von 200 mg/kg täglich i.p. injiziert. Phenylbutazon (Butazolidin, Fa. Geigy, Basel) kam in der Dosierung von 50 mg/kg täglich i.m. zur Applikation. DOCA (wasserlösliches Percorten, Fa. Ciba) kam einmalig in der Dosis von 50 mg/kg i.p. zur Anwendung, im Dauerversuch wurde die gleiche Dosis intramuskulär injiziert. Ascorbinsäure (Fa. Merck) wurde 10 Tage täglich oral zu 500 mg/kg verabreicht. Reduziertes Glutathion (Fa. Hoffmann-La Roche) kam während 10 Tagen zu 100 mg/kg i.p. täglich zur Anwendung.

Die Versuche wurden an je 5 Tieren von etwa gleichem Gewicht, Alter und Ernährungszustand durchgeführt. Die Blutentnahme erfolgte aus einem Ohrgefäß. Das austretende Blut wurde in Capillarröhrchen aufgefangen. Nach Zuschmelzung erfolgte Zentrifugierung etwa 30 min bei 2500 U/min. Das so erhaltene Serum trug man zur Glykoproteid- und Lipoproteidelektrophorese in einer Menge von 0,1 cm^3 und für die Serumproteinelektrophorese in einer Menge von 0,008 cm^3 auf Whatman-Papier Nr. 1 auf. Zur Verwendung kam ein Veronal-Natrium-Puffer vom p_H 8,6. Die beste Auftrennung des Meerschweinchenserums erreichten wir mit einer Stromspannung von 110 V über 16 Std. Da bei der elektrophoretischen Auftrennung oft eine sichere Unterscheidung der α- und β-Globulinfraktionen untereinander nicht möglich war, mußte jeweils die α_1- und α_2- bzw. die β_1- und β_2-Fraktion zusammengenommen werden, wie es auch Wunderly empfahl. Bei Auftragung der relativ großen Serummenge, die zur Bestimmung der Glyko- und Lipoproteide notwendig war, gelang oft die Trennung der α- und β-Globulinfraktionen nicht mit der wünschenswerten Deutlichkeit. Es mußte daher darauf verzichtet werden, zwischen einzelnen Glyko- bzw. Lipoproteid-Fraktionen zu unterscheiden. Alle Angaben der Glyko- oder Lipoproteide beziehen sich somit auf den jeweiligen Gesamtgehalt dieser Fraktionen im Serum. In Vorversuchen zeigte sich außerdem, daß die Aufstellung von Normalwerten des Meerschweinchens für die Serumproteinfraktionen und die Glyko- sowie Lipoproteide nicht möglich war, da immer wieder größere Schwankungen zwischen einzelnen Tieren beobachtet wurden. Es mußte daher von jedem Tier direkt vor dem Versuchsbeginn der jeweilige Ausgangswert ermittelt werden, der dann mit den Werten nach dem Versuch verglichen wurde.

Die Darstellung der Serumproteine erfolgte nach Grassmann u. Hannig. Die Anfärbung der Lipoproteide nahmen wir nach Swahn vor, die Glykoproteidfärbung nach den Angaben von Schmid, Pätzold u. Fink. Photometrisch wurden die Streifen nach Transparentmachung im Elphorgerät ausgewertet. Nach dem Vorgehen von Bansi u. Mitarb. legten wir zur Berechnung und Gegenüberstellung der Glyko- und Lipoproteidfraktionen nicht deren relatives prozentuales Verhältnis

zugrunde, sondern Planimetereinheiten, bezogen auf 0,1 cm^3 der aufgetragenen Serummenge.

Lediglich für das Verhalten der Albumine und der Globulinfraktionen erfolgte die Angabe wie üblich in Relativitätsprozenten.

Ergebnisse

Normalwerte. Wie die in Tab. 2 wiedergegebenen Mittel-, Minimal- und Maximalwerte von 100 Tieren erkennen lassen, bestehen von Tier zu Tier erhebliche Schwankungen, die für die Versuche die Feststellung von statistisch gesicherten Mittelwerten als Ausgangsbasis nicht zuließen. Es war daher notwendig, für jedes Tier vor und nach dem Versuch die individuellen Werte zu bestimmen. Von je 5 Tieren einer Versuchsgruppe ermittelten wir dann die Durchschnittswerte. Die Einzelwerte aller Tiere vor und nach Versuchsbeginn können aus der Dissertation von Ghiassi entnommen werden.

Die aufgezeigten Unterschiede dürften auch die Ursache für die in der Literatur voneinander abweichend angegebenen Normalwerte der Serumproteine für das Meerschweinchen sein (Deutsch, Gjessing, Edsall u. Angula-Ortega).

Versuche. Unter einem starken Entzündungsreiz, wie wir ihn durch die Verabreichung von Diphtherietoxin hervorriefen, trat eine sehr erhebliche Zunahme der Gesamtglyko- und Lipoproteide ein. Die Albumine erfuhren dabei eine gewisse Abnahme, während die α-Globuline zunahmen. Deutliche Veränderungen der β- und γ-Globuline waren nicht nachzuweisen (s. Tab. 1 u. 2). — Die Veränderungen der Glyko- und Lipoproteide entsprechen den bekannten Ergebnissen von Bergstermann und von Hoff. Die vorübergehende Abnahme der Lipoide, wie sie Schrade sah, konnten wir durch die spätere Blutkontrolle nicht erfassen.

Zur Auslösung eines definierten und in seinen Wirkungen auf den Organismus weitgehend bekannten entzündlichen Reizes benutzten wir einen bakteriellen Reizstoff. Es wurde ein Acyl-Lipopolysaccharid aus Salmonella abortus equi-Keimen verwendet, von dem durch die Untersuchungen von Westphal u. Mitarb., Keiderling, Wöhler u. Westphal gezeigt werden konnte, daß er nach Verabreichung durch Einwirkung auf körpereigene Zellen in der Lage ist, sogenannte endogene Reizstoffe freizusetzen, die dann einen Wirkungsmechanismus auslösen können, wie er vom Infekt her bekannt ist. Auch eine sehr starke Aktivierung des Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems wird dabei hervorgerufen.

Wie die Tab. 1 u. 2 deutlich werden lassen, traten auch in diesem Versuch erhebliche Zunahmen der Gesamt-Glyko- und Lipoproteide wie eine Verschiebung des Albumin-Globulin-Quotienten zugunsten der Globuline ein.

Tabelle 1

	Glyko-proteide	Lipo-proteide	Albumine	α-Globuline	β-Globuline	γ-Globuline
Diphth. Toxin 3½ dlm 6 Tage . . .	+++	+++	—	+	0	0
Bakt. Reizst. 1 γ pro kg 48 Std. . .	+++	++	—	+	+	+
ACTH einmalig 10,20 mg/kg 8 Std .	+	0	0	0	0	+
ACTH 100 mg/kg nach 8 Std. . . .	+	—	0	0	0	0
ACTH 50 mg/kg tägl. 6 Tage. . . .	+++	+++	—	+	—	++
Cortison 25, 50 u. 100 mg/kg n. 8 Std	+	—	0	0	0	0
Cortison 6 Tage tgl. 50 mg/kg . . .	+++	+++	0	0	0	0
Cortison 6 Tage tgl. 50 mg/kg oral .	++	+++	0	0	0	0
Decortin 50 mg/kg n. 8 Std	++	———	0	0	0	0
Dacortin 50 mg/kg n. 8 Std	+	———	0	0	0	0
DOCA 50 mg/kg n. 8 Std	0	—	0	0	0	0
STH 50 mg/kg n. 8 Std	++	+++	—	+	0	+
Thyroxin 1 mg/kg n. 8 Std.	—	0	0	0	0	0
Thyroxin 1 mg/kg tägl. 7 Tage . . .	++	+	—	+	0	0
Hungerversuch während 7 Tage . .	+	+++	0	0	0	0
Cystein 500 mg/kg n. 8 Std	0	0	0	0	0	0
Cystein 200 mg/kg tägl. 7 Tage lang.	0	0	0	0	0	0
Ascorbinsäure 500 mg/kg tägl. oral 10 Tage	0	0	0	0	0	0
Glutathion 100 mg/kg tägl. i.p. 10 Tg.	0	0	0	0	0	0
Beflavin 4 mg/kg tgl. i.p. 10 Tage. .	—	—	—	+	0	0
Phenylbutazon 50 mg/kg tgl. 3 Tage	0	0	0	0	0	0
Bakt. Reizst. 1 γ/kg u. Cortison 50 mg/kg 4 Tage	0	0	0	0	0	0
Bakt. Reizst. 1 γ/kg und Phenyl-butazon 50 mg/kg 5 Tage	0	0	0	0	0	0
Thyroxin 1 mg/kg und Phenyl-butazon 50 mg/kg 5 Tage	0	0	0	0	0	0
Bakt. Reizst. 1 γ/kg und DOCA 50 mg/kg 4 Tage	++	+++	0	0	0	0

Zunahme: + bis 25% Abnahme: — bis 25%
++ bis 50% —— bis 50%
+++ bis 100% und mehr ——— über 50%
Keine erhebliche Veränderung: 0 (bis etwa 15%) Mittelwert von 5 Tieren.

Es war also unter den gewählten Bedingungen in beiden Versuchen zu charakteristischen Veränderungen der genannten Serumfraktionen gekommen, wie sie als Ausdruck eines akut entzündlichen Geschehens anzusehen sind. Inwieweit diese beobachteten Veränderungen etwa als Hypophysen-Nebennierenrindenaktivierung gewertet werden müssen und ob die bei einer Aktivierung der Nebennierenrinde vermehrt an den Organismus abgegebenen Glucocorticoide selber ein charakteristisches Serumspektrum hervorrufen können, sollte unter ACTH, Cortison, Dehydrocortison und Dehydrohydrocortison untersucht werden. Unter Substanzen also, von denen aus der Klinik eine erhebliche entzündungshemmende Wirkung bekannt ist.

In Abhängigkeit von der steigenden Dosierung des ACTH kam es in den kurzfristigen Versuchen zu einer geringgradigen Vermehrung der Gesamt-Glykoproteide, die selbst bei der maximalen Dosierung von 100 mg/kg nur 20% beträgt. Die Lipoproteide erfuhren eine geringe Abnahme, die jedoch nur bei maximaler Dosierung in Erscheinung trat. Die Albumin- und Globulinfraktionen ließen keine gesicherten Veränderungen erkennen.

Da es von besonderer Bedeutung erschien, ob die kurzfristig durch ACTH hervorgerufenen Veränderungen auch nach mehrmaliger Gabe gleich oder in stärkerem Maße auftreten würden, erhielt eine Versuchsgruppe an 6 Tagen jeweils 50 mg/kg Depot-ACTH i.m. Wie aus den Tabellen hervorgeht, trat eine sehr starke Vermehrung der Gesamt-Glyko- und Lipoproteide ein. Auch die Verschiebung des Albumin-Globulin-Quotienten entsprach etwa derjenigen unter dem Infekt. Diese Veränderungen der Proteinfraktionen decken sich mit den durch die Literatur bekannt gewordenen Ergebnissen von Hoch-Ligeti u. Irvine. In den kurzfristigen Versuchen mit Cortison erfolgte selbst bei der sehr hohen Dosierung nur eine geringe Zunahme der Glykoproteide bei Abnahme der Lipoproteide. Dagegen wiesen die Serumproteinfraktionen keine wesentlichen Veränderungen auf. Im Kurzversuch unter Prednison und Prednisolon wurden allerdings eine stärkere Zunahme der Glykoproteide und eine sehr erhebliche Abnahme der Lipoproteide deutlich. Die Serumproteine erfuhren keine sichere Beeinflussung. Unter i.m. und oraler Cortisongabe im Dauerversuch erfolgte wiederum eine Zunahme der Glykoproteide und nun auch überraschenderweise der Lipoproteide. Die Unterschiede in der Zunahme zwischen i.m. und oraler Verabreichung sind wohl Folge der Applikationsart. Die Serumproteine blieben in beiden Dauerversuchen praktisch unverändert.

Es zeigte sich also, daß die reinen Glucocorticoide im Kurzversuch zu einer Abnahme der Lipoproteide, im Dauerversuch zu ihrer Vermehrung führen. Die Glykoproteide nahmen regelmäßig zu.

Tabelle 2

	Glykoproteide		Lipoproteide		Albumine		α-Globuline		β-Globuline		γ-Globuline	
Mittelwert von 100 Tieren	0,53		0,352		52,85%		24,7%		10,1%		11,75%	
Min.-Max. Wert	0,14—1,1		0,05—0,8		43—65%		20—31%		5—26%		6—31%	
Ergebnisse	vor	nach	vor	nach	vor %	nach %	vor %	nach %	vor %	nach %	vor %	nach %
Diphth. Toxin 3 × ½ dlm 6 Tage	0,51	1,58	0,29	0,74	51	43	26	33	10	11	12	13
Bakt. Reizst. 1 γ/kg 48 Std i.p.	0,63	1,1	0,33	0,5	51	43	24	29	10	13	12	16
ACTH einmalig 10 mg/kg i.p.	0,59	0,67	0,17	0,34	48	48	25	25	12	10	14	17
ACTH einmalig 20 mg/kg i.p.	0,49	0,6	0,4	0,46	45	44	21	20	13	10	20	24
ACTH 100 mg/kg nach 8 Std.	0,62	0,74	0,65	0,48	50	52	25	26	12	8	13	12
ACTH 50 mg/kg tgl. 6 Tage i.m.	0,66	1,2	0,24	0,57	60	49	23	30	8	7	8	11
Cortison 25 mg/kg nach 8 Std	0,56	0,7	0,35	0,18	50	50	26	24	11	9	13	17
Cortison 50 mg/kg nach 8 Std	0,35	0,48	0,28	0,14								
Cortison 100 mg/kg nach 8 Std	0,59	0,66	0,31	0,19	48	49	24	24	10	11	15	17
Cortison 50 mg/kg tgl. 6 Tage i.m.	0,41	0,76	0,25	0,53	53	53	26	26	8,2	9,2	11	10,6
Cortison 50 mg/kg tgl. 6 Tage oral	0,50	0,80	0,32	0,52	53	50	26	25	14	14	11	10
Decortin 50 mg/kg nach 8 Std i.p.	0,24	0,38	0,21	0,07	53	55	26	25	11	8	10	12
Dacortin 50 mg/kg nach 8 Std i.p.	0,37	0,44	0,39	0,12	54	57	26	26	10	6,5	8	10
DOCA 50 mg/kg i.p. nach 8 Std	0,47	0,45	0,49	0,27	50	50	26	27	10	8	13	15
STH 50 mg/kg nach 8 Std	0,86	1,2	0,33	0,63	51	42	27	30	12	11	10	16
Thyroxin 1 mg/kg i.p. nach 8 Std	0,63	0,55	0,42	0,45	52	51	25	26	10	8	12	14
Thyroxin 1 mg/kg i.m. tgl. 7 Tage	0,37	0,60	0,2	0,22	58	51	24	30	10	8	9	10
Hungerversuch über 7 Tage	0,69	0,8	0,1	0,26	54	51	23	25	9	10	10	12
Cystein 500 mg/kg nach 8 Std	0,58	0,69	0,32	0,28	52	52	27	29	10	9	9	10

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Cystein 200 mg/kg tgl. 7 Tage	0,8	0,9	0,53	0,44	55	54	24	23	10	9	11	12
Ascorbins. oral 500 mg/kg 10 Tage	0,41	0,42	0,31	0,31	58	58	22	22	9	11	11	10
Glutathion 100 mg/kg 10 Tage	0,6	0,69	0,31	0,39	54	53	27	26	8	8	12	12
Beflavin 4 mg/kg i.p. 10 Tage	0,48	0,36	0,45	0,33	57	49	25	30	8	11	10	11
Phenylbutazon 50 mg/kg tgl. 3 Tage . . .	0,48	0,49	0,32	0,30	56	56	24	25	10	9	11	11
B. Reizst. 1 γ/kg + Cortis. 50 mg 4 Tage .	0,42	0,44	0,25	0,28	54	56	25	24	10	10	11	10
B. Reizst. 1 γ/kg + Ph.but. 50 mg 5 Tage .	0,52	0,48	0,33	0,32	56	56	24	25	9	8	11	10
Thyrox. 1 mg/kg + Ph.but. 50 mg 6 Tage .	0,36	0,37	0,31	0,33	55	55	22	24	10	10	12	12
B. Reizst. 1 γ/kg + DOCA 50 mg 4 Tage .	0,39	0,52	0,41	0,66	54	52	27	29	9	8	11	11

Werte der Glyko- und Lipoproteide in Planimetereinheiten bezogen auf 0,1 cm³ Meerschweinchenserum

Nach Verabfolgung des Mineralocorticoids (DOCA) wurde nach 8 Std eine erhebliche Verminderung der Lipoproteide gesehen, während die Glykoproteide und die Serumproteine unbeeinflußt blieben.

Nachdem in den vorhergehenden Untersuchungen die Veränderungen der Glyko- und Lipoproteide wie der Serumproteine unter dem Infekt, unter ACTH und Cortison aufgezeigt werden konnten, interessierte die Prüfung von Substanzen, die eine Entzündung zu fördern imstande sind. Als Vertreter solcher Stoffe wurden das somatotrope Hormon und Thyroxin geprüft.

Wie aus den Tabellen ersichtlich, führte STH zu einer Vermehrung der Glyko- und Lipoproteide bei gleichzeitiger Verschiebung des Albumin-Globulin-Quotienten.

Thyroxin bewirkte im Kurzversuch eine Abnahme der Glykoproteide. Im Gewöhnungsversuch, bei dem die Versuchstiere durchschnittlich 125 g bei einem Ausgangsgewicht von 400 g abnahmen, erfolgte eine stärkere Zunahme der Glyko-, geringer der Lipoproteide und Abnahme der Albumine bei Vermehrung der α-Globuline. Diese Versuchsergebnisse stimmen mit den Beobachtungen bei Hyperthyreosen überein, bei denen ebenfalls eine Zunahme der Mucopolysaccharide (Bergstermann), eine geringe Vermehrung der Lipoproteide (Weikker) und eine Verminderung der Albumine bei Zunahme der Globuline (Lamberg u. Grasbeck) gefunden wurde.

In einem weiteren Versuch zur Klärung des Einflusses bestimmter

Stoffwechselvorgänge auf die genannten Serumfraktionen wurde an 5 Tieren ein Hungerversuch über 7 Tage durchgeführt. Während dieser Zeit nahmen die Tiere durchschnittlich etwa 25% ihres Ausgangsgewichtes ab. Wie man erkennt, trat eine starke Zunahme der Lipoproteide ein, während die Glykoproteide im Vergleich zur Ausgangssituation nicht wesentlich verändert waren. Die Albumine und die Globulinfraktionen wiesen nur unwesentliche Veränderungen auf.

Bei der Untersuchung entzündungsfördernder und entzündungshemmender Substanzen mußte es auch von Interesse sein, einen Stoff wie das Cystein zu untersuchen, von dem Lotze in tierexperimentellen Untersuchungen zeigen konnte, daß er bei Infektzuständen eine lebensverlängernde Wirkung besitzt. Lotze glaubte diesen Effekt, der außer dem Cystein auch der Ascorbinsäure und dem Glutathion zukommen soll, durch eine aktivierende Wirkung auf das RES erklären zu können. Cystein prüften wir im Kurz- und Dauerversuch. Die Glykoproteide wiesen in diesen Versuchen nur eine sehr geringe Zunahme auf, während die Lipoproteide leicht abfielen. Die Serumproteinfraktionen blieben unbeeinflußt. Auch nach Verabreichung einer relativ sehr hohen Dosis Ascorbinsäure traten keine verwertbaren Veränderungen ein. Glutathion führte zu einer wohl noch im Bereich des Physiologischen liegenden Zunahme der Glyko- und Lipoproteide, während die Serumproteine sich nicht veränderten.

Durch die eingehenden klinischen Untersuchungen von Heilmeyer u. Mitarb. — die von vielen Nachuntersuchern bestätigt wurden — konnte die außerordentliche entzündungshemmende Wirkung des Phenylbutazons aufgezeigt werden. Es erschien daher von großer Wichtigkeit, ob diesem Stoff ein Einfluß auf die Glyko- und Lipoproteide des Serums zukommen würde. Wie die Tabellen erkennen lassen, war das Phenylbutazon trotz der relativ hohen Dosierung ohne Einfluß auf die untersuchten Serumfraktionen.

Nachdem die vorhergehenden Versuche zeigten, daß unter entzündlichen Reizen bestimmte charakteristische Veränderungen der Glyko- und Lipoproteide wie auch im Verhalten der Albumine zu den einzelnen Globulinfraktionen eintreten, sollte untersucht werden, ob diese Veränderungen durch eine Vorbehandlung mit Cortison verhindert werden könnten. Eine Tiergruppe erhielt daher an 4 Tagen jeweils 50 mg pro Kilogramm Cortison i.m. Am 3. und 4. Tage wurde 0,2 bzw. 0,8 γ/kg bakterieller Reizstoff (Pyrexal) i.p. injiziert. Die Blutentnahme erfolgte 24 Std nach der letzten Injektion. Wie man erkennt, war unter diesen Versuchsbedingungen keine Änderung der Serumfraktionen eingetreten, die im Sinne eines entzündlichen Geschehens oder einer reinen Cortisonwirkung zu deuten war.

In einem weiteren Versuch prüften wir, ob das Phenylbutazon in der Lage sei, die charakteristischen Veränderungen, wie sie durch Pyrexal hervorgerufen werden, zu unterdrücken. 5 Tieren wurden an 5 Tagen je 50 mg pro Kilogramm Phenylbutazon i.m. verabreicht. Am 4. und 5. Tage injizierten wir Pyrexal in derselben Dosierung wie beim Cortison. Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, war auch das Phenylbutazon imstande, Veränderungen der Glyko- und Lipoproteide wie der Serumfraktionen zu unterbinden.

In diesem Zusammenhang untersuchten wir, ob das Phenylbutazon auch in der Lage sein könnte, die Thyroxinwirkung zu blockieren. Wir verabreichten einer Tiergruppe an 6 Tagen jeweils 50 mg pro Kilogramm Phenylbutazon. Am 4., 5. und 6. Tage wurde zusätzlich 1 mg pro Kilogramm Thyroxin i.m. verabreicht. Auch unter dieser Versuchsanordnung blieben charakteristische Veränderungen der Glyko- und Lipoproteide wie Serumproteine aus. Das Phenylbutazon war somit in der Lage, die früher beobachteten Thyroxinstoffwechselwirkungen zu unterdrücken.

Weiterhin prüften wir DOCA und bakteriellen Reizstoff. Eine Versuchsgruppe erhielt an 4 Tagen 50 mg/kg DOCA i.m. täglich und am 3. und 4. Tag Pyrexal, insgesamt 1 γ/kg i.p. Die Serumkontrolle ergab eine erhebliche Zunahme der Glyko- und Lipoproteide. Veränderungen der Serumproteine traten nicht auf, bzw. lagen im Bereich der Fehlerbreite.

Letztlich untersuchten wir die Wirkung von Lactoflavin (Beflavin, Hoffmann-La Roche) in einem Dauerversuch über 10 Tage bei täglicher Verabreichung von 4 mg/kg i.p. Wie aus den Tabellen hervorgeht, kam es zu einer Verminderung der Glyko- und Lipoproteide, während der Albumin-Globulin-Quotient zugunsten der Globuline anstieg.

Diskussion

Da die Durchführung dieser experimentellen Untersuchungen an eine relativ große Zahl kleiner Laboratoriumstiere gebunden war, mußte durch die Schwierigkeit bei der elektrophoretischen Auftrennung der benötigten Serummengen auf die Bestimmung der wichtigen Relationen der einzelnen Glykoproteid- bzw. Lipoproteidfraktionen verzichtet werden. Wir glaubten, dies aber um so eher zu können, da ein erster allgemeiner Überblick über die Veränderungen der gesamten Glyko- bzw. Lipoproteide unter den verschiedensten Einflüssen gewonnen werden sollte.

Wie die Ergebnisse zeigten, kam es unter einem entzündlichen Reiz zu einer Vermehrung der Glykoproteide und Lipoproteide; auch die zu erwartende Verschiebung des Albumin-Globulin-Quotienten trat ein. Dabei ist es wahrscheinlich, daß wir die von Schrade nach Pyrifergabe frühzeitig beobachtete Abnahme der Blutlipoide vor ihrem Anstieg aus zeitlichen Gründen nicht erfaßten.

Daß die Veränderungen der Glyko- und Lipoproteide von der Aktivierung des Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems weitgehend abhängig sind, dürfte wohl aus den Versuchen mit ACTH und Cortison hervorgehen. Dabei fand sich kurze Zeit nach der Verabreichung dieser Hormone eine sichere Verminderung der Lipoproteide ähnlich den Versuchsergebnissen von Leupold u. Reiss. Die Glykoproteide wiesen innerhalb 8 Std nur eine geringe Zunahme auf. Nach langdauernder Hormonverabreichung trat eine erhebliche Vermehrung beider Fraktionen ein. Die Veränderungen der Glykoproteide sind mit großer Wahrscheinlichkeit als ausgesprochener Glucocorticoideffekt anzusprechen, da ein solcher Effekt unter DOCA ausblieb. Ein Befund, der auch von Bergstermann erhoben wurde. Unter dem prophlogistisch wirkenden STH (Taubenhaus) sahen wir ein Verhalten wie unter ACTH, wobei jedoch infolge der bekannten Reinigungsschwierigkeiten bei der Herstellung des Präparates eine echte ACTH-Wirkung nicht ausgeschlossen werden kann. Interessant erscheint aber, daß die Verschiebung des Albumin-Globulin-Quotienten ähnlich — der wie nach entzündlichen Reizen — nicht unter den reinen Glucocorticoidpräparaten, sondern nur bei Anwendung der Hypophysenvorderlappenpräparate auftrat. Inwieweit hier eine spezifische Wirkung des Hypophysenvorderlappens auf die Serumproteine vorliegen kann, muß offen gelassen werden.

Eine Erklärung für das Verhalten der Glykoproteide unter den verschiedenen Bedingungen erscheint auf Grund der bis jetzt bekannt gewordenen Ergebnisse sehr schwierig, stehen sie doch stoffwechselmäßig mit ihrem Gehalt an Hexosamin zwischen den Kohlenhydraten und Eiweißkörpern (Bergstermann). Einmal führten die verschiedenen Versuchsbedingungen vor allem unter ACTH und Cortison wie STH zu den bekannten Wirkungen auf den Eiweißstoffwechsel (Borden; Bergenstal u. a.), andererseits ist es gesichert, daß sowohl unter bakteriellen Reizstoffen eine Blutzuckersteigerung (Westphal u. Mitarb.) wie auch unter ACTH und Cortison eine vermehrte Gluconeogenese bei gehemmter Glucoseverbrennung mit Hyperglykämie und Glucosurie eintritt. Auch unter STH und Thyroxin wie im Hungerversuch ist der Kohlenhydratstoffwechsel besonderen Bedingungen unterworfen (Marx; Houssay).

Auffällig muß erscheinen, daß nur unter DOCA, welches keine besondere Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel entfaltet, eine wesentliche Veränderung der Glykoproteide ausblieb. Wir möchten daher eine mögliche Beziehung zum Kohlenhydratstoffwechsel nicht ganz ablehnen, zumal auch unter Adrenalin (Good) und beim Diabetes (Mohnike u. a.) Erhöhungen der Glykoproteide beobachtet wurden.

Die Veränderungen der Lipoproteide können wohl bis zu einem gewissen Grade als Spiegelbild des Verhaltens des Fettstoffwechsels

gedeutet werden, wobei es immer zuerst zu einer Abnahme und dann infolge der vermehrten Mobilisation unter ACTH, Cortison und STH (Stetten; Sala; Weil u. a.) zu der Vermehrung der Blutlipoide und damit auch der Lipoproteide kommt.

Die Untersuchung der stark reduktiv wirkenden Substanzen Cystein, Ascorbinsäure und Glutathion ergab keine gesicherte Beeinflussung der verschiedenen Serumfraktionen. Ob daraus gefolgert werden darf, daß diese Substanzen für sich keine hormonale oder vegetative Regulation auslösen können, muß dahingestellt bleiben. Überraschenderweise führte demgegenüber das Lactoflavin zu einer Abnahme der Glyko- und Lipoproteide sowie einer Verschiebung des Albumin-Globulin-Quotienten. Zur Erklärung dieses Befundes darf auf die früher von Beiglböck u. Mitarb. gesehene Wirkung des Lactoflavins auf den Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fettstoffwechsel hingewiesen werden.

Zur Prüfung der Entzündungshemmung von Cortison, Phenylbutazon und DOCA bedienten wir uns eines bakteriellen Reizstoffes, von dem durch die Untersuchungen von Westphal u. Mitarb. sowie Spector bekannt ist, daß er nach Einverleibung zuerst eine celluläre Reizung bewirkt, die dann zur Freisetzung endogener Reizstoffe führt, welche die eigentliche Reizantwort des Organismus mit Hypophysen-Nebennierenrinden-Aktivierung und vegetativer Gesamtumschaltung (Hoff) auslöst.

Cortison, das wir in einer relativ hohen Dosierung gaben, unterdrückte die vom Pyrexal allein beobachteten Wirkungen auf die Serumfraktionen. Dabei muß darauf hingewiesen werden, daß die Art der Anwendung und Dosierung wohl ausschlaggebend war, da Keiderling (pers. Mittlg.) unter ACTH und Cortison nur eine Hemmung aber keine Aufhebung des Pyrexaleffektes in seinen Untersuchungen erreichen konnte. Die auch unter Phenylbutazon verhinderte Pyrexalwirkung legt die Vermutung nahe, daß diesem Medikament eine direkte Zellwirkung zukommt, nachdem eine Nebennierenrindenwirkung nicht besteht. Inwieweit bei unserem Versuch die Hemmung der Schilddrüsenfunktion durch Phenylbutazon (Eger u. Krüskemper) eine Rolle spielt, bleibt offen.

Unter DOCA trat dagegen eine Zunahme der Glyko- und Lipoproteide wie unter entzündlichen Reizen auf. Eine Verstärkungswirkung im Sinne des Prophlogismus (Selye) liegt wohl nicht vor. Vielleicht besteht insofern doch eine geringe Hemmwirkung als die Veränderungen der Proteine ausblieben. Aber auch von Heilmeyer u. Mitarb. konnte vom DOCA in ausgedehnten Untersuchungen keine sichere prophlogistische Wirkung des DOCA gefunden werden.

Die durch Phenylbutazon erfolgte Aufhebung der Wirkung des intramuskulär gegebenen Thyroxins darf vielleicht so interpretiert werden, daß das Phenylbutazon eine Hemmung des Atmungsstoffwechsels in der

Zelle bewirkt (Holzer u. Mitarb.) und daß dadurch die Entkoppelung der Atmungskettenphosphorylierung (Martius u. Hess), welche eine spezifische Thyroxinwirkung darstellt und in ihrem Gefolge die bekannten Gesamtstoffwechselveränderungen hervorruft, ausbleibt.

Zusammenfassung

Entzündliche Reize wie auch ACTH, Cortison, STH und Thyroxin führten zu bestimmten Veränderungen der Gesamt-Glyko- und Lipoproteide und zum Teil der Serumproteine. Substanzen mit einem hohen Reduktionsvermögen — Ascorbinsäure, Cystein und Glutathion — bewirkten keine Änderung. Cortison und Phenylbutazon waren im Gegensatz zu Desoxycorticosteron in der Lage, die durch einen bakteriellen Reizstoff hervorgerufenen Veränderungen zu unterdrücken. Auch die Thyroxinwirkung konnte durch Phenylbutazon aufgehoben werden.

Literatur

Albrich, E., u. W. Beiglböck: Wien. Arch. inn. Med. **34**, 145 (1940). — Angula-Ortega, A.: Beitr. Klin. Tbk. **111**, 229 (1954). — Bansi, H. W., Th. Gronow u. H. Redetzki: Klin. Wschr. **1955**, 102. — Beiglböck, W., H. Hoff u. R. Clotten: Zur Frage der Cortisonwirkung. Augsburg: Selbstverlag 1950. — Bergenstal, D. M., R. L. Landau, J. Kirsner and K. Lugibihl: Proc. 2nd. Clin. ACTH Conf. **1**, 250. New York: Blakiston Co. 1951. — Bergstermann, H.: Erg. inn. Med. **7**, 1 (1956). — Borden, A. L., E. B. Wallraff, E. C. Brodie, W. P. Holbrook, F. D. Hill, C. A. F. Stephens jr., R. B. Johnson and A. R. Kemmerer: Federat. Proc. **10**, 376 (1951). — Deutsch, H. F., and M. B. Goodloe: J. of Biol. Chem. **161**, 1 (1945). — Edsall, J. T.: Adv. Protein. Chem. **3**, 383 (1947). — Eger, W.: 3. Europ. Rheumat. Kongr. Scheveningen 1955. — Eichenberger, E., M. Schmidhauser-Kopp, H. Hurni, M. Friscay und O. Westphal: Schweiz. med. Wschr. **1955**, 1190. — Ghiassi, K.: Inaug. Diss. Freiburg 1957. — Gjessing, E. C., St. Ludewig and A. Chanutin: J. of Biol. Chem. **174**, 683 (1943). — Good, R. A., V. C. Kelley, D. Glick and T. A. Good: Federat. Proc. **9**, 178 (1950). — Grassmann, W., u. K. Hannig: Dtsch. med. Wschr. **1951**, 76. — Heilmeyer, L., H. G. Harwerth, J. Doxie und R. Kraus: Arzneimittel-Forsch. **3**, 161 (1953). — Heilmeyer, L.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 1956. — Hoch-Ligeti, C., and K. Irvine: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **87**, 324 (1954). — Hoff, F.: 45. Kongr. Dtsch. Ges. inn. Med. 1933, S. 124. — Houssay, B. A.: Endocrinology (Springfield, Ill.) **35**, 158 (1944). — Keiderling, W., F. Wöhler und O. Westphal: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 293 (1953). — Knüchel, F., u. F. Kienle: Ärztl. Forsch. **4**, 81 (1950). — Krüskemper, H. L.: 3. Europ. Rheumatol. Kongr. Scheveningen 1955. — Kühnau, J.: Dtsch. med. Wschr. **1937**, 352. — Lamberg, B. A., u. R. Grasbeck: Acta endocrinol. (Copenh.) **19**, 91 (1954). — Leupold, F., H. Büttner und K. Ranninger: Klin. Wschr. **1954**, 745. — Leupold, F., u. H. Büttner: Klin. Wschr. **1956**, 1088. — Lotze, H.: Med. Welt **1936**, H. 14 u. 18. — Martius, C., and B. Hess: Arch. of Biochem. a. Biophysics **33**, 486 (1951). — Marx, W., M. E. Simpson, C. H. Li and H. M. Evans: Endocrinology (Springfield, Ill.) **33**, 102 (1943). — Mohnike, G., u. H. Richter: Z. klin. Med. **151**, 463 (1954). — Payne, R. W., M. R. Shetlar and J. A. Bulloch: Arch. Int. Med. **40**, 775 (1954). — Reiss, M., S. Thaddea und W. Fasshauer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **182**, 477 (1936). — Sala, G.,

A. Amira, M. Borasi and C. Cavallero: Lancet **1951** I, 641. — Schmid, J., E. Pätzold und R. Fink: Wien. Z. inn. Med. **36**, H. 12 (1955). — Schrade, W.: Zbl. exper. Med. **110**, 518, 623 (1942). — Dtsch. med. Wschr. **1956**, 617. — Sedlmayr, G., A. Kemnitz und H. Holzer: Klin. Wschr. **1956**, 1114. — Seibert, F. B., M. V. A. Seibert, A. J. Atno and H. W. Campbell: J. Clin. Invest. **26**, 90 (1947). — Seibert, F. B., M. L. Pfaff and M. V. A. Seibert: Arch. of Biochem. **18**, 279 (1948). — Selye, H.: Annual Report on Stress, Acta, INC Medical Publishers Montreal Canada (1950—51). — Spector, W. G.: J. of Path. **63**, 93 (1951). — Stary, Z.: Fortschr. Med. **71**, 517 (1953). — Stetten, D., and J. Salcedo: J. of Biol. Chem. **156**, 27 (1944). — Swahn, B.: Scand. J. Clin. Lab. Inv. Suppl. **9**, 5 (1953). — Taubenhaus, M., and G. D. Amromin: J. Labor. a. Clin. Med. **36**, 7 (1950). — Weicker, H.: Ärztl. Wschr. **1956**, 100. — Weil, B., u. S. Ross: Endocrinology (Springfield, Ill.) **45**, 207 (1949). — Weissbecker, L.: Klinik der Nebennierenrindeninsuffizienz und ihre Grundlagen. Stuttgart: F. Enke 1954. — Westphal, O., O. Lüderitz, E. Eichenberger und W. Keiderling: Z. Naturforsch. **7**b, 534 (1952). — Wunderly, Ch., W. Bolley, F. Wuhrmann und S. Piller: Klin. Wschr. **1954**, 425. — Wunderly, Ch.: Die Papierelektrophorese. Aarau u. Frankfurt a.M.: H. R. Sauerländer u. Co. 1954.

Dr. Friedrich Wöhler, Freiburg/Brsg., Medizinische Universitätsklinik

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 174—177 (1957)

Aus dem physiologischen Institut der medizinischen Fakultät der Karls-Universität in Prag, Pilsen (Vorstand: Dozent Dr. Adolf Zelený)

Beziehung zwischen Chloropromazin und dem Fettgehalt des Blutserums

Von

V. Lindaur und M. Cerhová*

(Eingegangen am 25. Dezember 1956)

Das Problem der metabolischen Wirkung von Chloropromazin wird oft behandelt und diskutiert.

Laborit u. Benitte (1954) weisen darauf hin, daß es bei Verabreichung von Chloropromazin zu einer Senkung des Körpergewichtes kommt und daß der Energieverbrauch des Organismus überwiegend von Eiweißstoffen gedeckt wird. Neuwirt u. Braun (1956) haben bewiesen, daß es nach Verabreichung von Chloropromazin zu einer negativen Stickstoffbilanz kommt. Was die Umsetzung von Kohlenhydraten anbelangt, geht aus den Arbeiten von Wynn, V. (1954) Mundeller u. Mitarb. (1953) Bamdas u. Mitarb., (1955) hervor daß es nach der Applikation von Chloropromazin zu einer Verzögerung des Metabolismus von Kohlenhydraten kommt. In unserer früheren Arbeit (Lindaur, 1956) haben wir bewiesen, daß nach Verabreichung von Chloropromazin beim Kaninchen eine bedeutende Verlangsamung der Kohlenhydrateresorption und eine Verzögerung des Glucoseübertrittes aus dem Blute in die Gewebe entstehen. Laborit (1954) macht auf den Unterschied aufmerksam, der zwischen der Energiequelle bei Winterschläfern und der Pharmakohibernation besteht. Während diese bei den ersteren überwiegend Vorratsfette bilden, liegt bei der Pharmakohibernation das Hauptgewicht auf den Eiweißstoffen. Laborit weist hier weiter auf die Wirkung des STH, welches eine bedeutende Änderung dieser Beziehung hervorruft.

Lamarche u. Arnould (1955) bewiesen, daß das Chloropromazin sogar in sehr kleinen Gaben eine Senkung des Tonus und eine Schwächung der Motilität des isolierten Kaninchendarmes bewirkt. Wir stellten uns also die Frage, inwieweit das Chloropromazin die Resorption der Fette beeinflußt und ob dieses Arzneimittel selbst irgendeine Wirkung auf den Fettgehalt im Blutserum ausübt.

Methodik

Bei den Versuchen verwendeten wir 6 annähernd gleichaltrige deutsche Schäferhunde im Gewicht von je 19—25 kg. Diese Hunde wurden mit standardisiertem Futter ernährt und stets 24 Std vor dem Versuche nüchtern gehalten. Das Fett wurde ihnen in Form von 5 g Speck mit kontrolliertem Fettgehalt (76%) je Kilogramm Körpergewicht zugeführt. Das Chloropromazin wurde ihnen in Dosen von 1 mg/kg K.G. intramuskulär eingespritzt. Blutproben wurden den subcutanen Venen der Gliedmassen in bestimmten Zeitabständen entnommen. Der Fettgehalt im Serum wurde colorimetrisch nach Swahn festgestellt und in mg-% ausgedrückt. Als Standard verwendeten wir eine 1%ige Lösung von Olivenöl in Chloroform.

* Wir danken für die Mitarbeit dem Herrn J. Bešťák, techn. Assist. und Frau M. Bakalová, Sekretärin des Physiolog. Institutes.

Experimente und Resultate

Vorerst mußten wir den Fettgehalt im Serum unserer Versuchstiere in nüchternem Zustand feststellen. Wir sind uns dessen bewußt, daß die Lipämiewerte gewöhnlich bedeutenden Schwankungen unterworfen sind. Für unsere Versuchsgruppe ergaben sich bei ihrer relativen Gleichart und den Standardbedingungen ziemlich homogene Werte. Der Fettgehalt im Serum lag bei $412 \pm 56{,}1$ mg-%. Nach dieser Feststellung begannen wir den Tieren Fett in Form von Speck zu verabreichen, der in Mengen von 5 g je Kilogramm (entsprechend 3,8 g Fett je Kilogramm) spontan aufgenommen wurde. Proben venösen Blutes entnahmen wir in Zeitabständen von 2 und 4 Std nach Verabreichung des Fettes. Die Resultate dieser Versuche sind in Tab. 1 enthalten.

Tabelle 1. *Fettgehalt im Serum in mg-%*
N Anzahl der Fälle, $Xn - Xz$ der arithmetische Unterschied gegenüber der Norm, *t* der Wert des T-Testes, *p* statistische Bedeutung und σ mittlere Abweichung. (Die arithmetischen Unterschiede und Signifikanzen beziehen sich auf den Ausgangswert)

	mg-%	*N*	$Xn - Xz$	*t*	*p*	σ
im Ruhezustand	412	22	—	—	—	$\pm$ 56,1
nach 2 Std	556	10	144	6,32	$< 0{,}01$	$\pm$ 62,4
nach 4 Std	850	11	438	16,8	$< 0{,}01$	$\pm$ 95,0

Diese Werte beweisen, daß sich nach Verabreichung von Fett der Fettgehalt im Serum bereits nach 2 Std um 33% erhöht hat ($p < 0{,}01$), 4 Std nach der Fettzufuhr um 106%! Diese Erhöhung ist wiederum statistisch sehr gut gesichert ($p < 0{,}01$).

Nach Feststellung dieser Grundwerte begannen wir mit der Verabreichung von Chloropromazin i.m. in Dosen von 1 mg/kg Körpergewicht.

Vorerst ging es uns darum festzustellen, wie Chloropromazin allein auf den Fettgehalt im Blutserum wirkt. Nach Verlauf von 1 Std nach Verabreichung von Chloropromazin wurden Werte festgestellt, welche in Tab. 2 angeführt sind:

Tabelle 2

	mg-%	*N*	$Xn - Xz$	*t*	*p*	σ
im Ruhezustand	412	22	—	—	—	56,1
Chloropromazin 1 mg/1 kg . .	504	8	92	4,05	0,01	63,2

Aus der Tab. 2 ist ersichtlich, daß Chloropromazin in der angeführten Dosis den Fettgehalt im Serum um 22% erhöht. Diese Erhöhung ist statistisch gesichert, $p < 0{,}01$.

In weiteren Versuchsreihen untersuchten wir, inwieweit das Chloropromazin die Veränderungen des Fettes im Blutserum nach Verabreichung von Fetten beeinflußt.

Die Experimente wurden folgendermaßen durchgeführt: Nach Verlauf der 1. Std nach i.m. Einspritzung von 1 mg Chloropromazin je Kilogramm wurde den Tieren Fett in derselben Menge wie bei den Kontrollversuchen verabreicht. Die in Blutproben nach 2 und 4 Std gewonnenen Werte sind in Tab. 3 angeführt.

Tabelle 3 *(Bezeichnungen wie in Tab. 1)*

	mg-%	N	Xn-Xn	t	p	σ
nüchtern	412	22	—	—	—	56,1
Chloropromazin u. Fett nach 2 Std	580	8	168	6,3	$< 0{,}01$	74,0
Chloropromazin u. Fett nach 4 Std	560	11	148	6,28	$< 0{,}01$	75,0

Über die Steigerung der Lipämie nach bloßer Einspritzung von Chloropromazin hinaus tritt nach Verabreichung von Fetten nach 2 Std eine Erhöhung um 41% auf; so verbleibt der Fettgehalt im Blutserum auch nach 4 Std. Wenn wir die bei den Kontrolltieren nach Fettzufuhr erzielten Lipämiewerte mit den nach Verabreichung von Fett und Chloropromazin erhaltenen Werten vergleichen, bekommen wir das gegenseitige Verhältnis, welches in der weiteren Tab. 4 veranschaulicht ist.

Tabelle 4 *(Bezeichnungen wie Tab. 1)*

	mg-%	N	Xn-Xz	t	p	σ
Kontrolle nach 2 Std	556	10	—	—	—	62,4
Chloropromazin nach 2 Std	580	8	36	1,06	$< 0{,}5$	74,0
Kontrolle nach 4 Std	850	11	—	—	—	95,0
Chloropromazin nach 4 Std	560	11	290	7,45	$< 0{,}01$	75,0

Nach diesen Werten besteht nach 2 Std kein wesentlicher Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den Tieren nach Applikation von Chloropromazin ($p < 0{,}5$). Ein durchaus signifikanter Unterschied entsteht jedoch nach 4 Std ohne und mit Chloropromazin.

Diskussion

Nach Verabreichung von Chloropromazin ist der Fettgehalt im Blutserum erhöht und die Fettresorption bedeutend herabgesetzt und verzögert. Hier ergibt sich eine klare Analogie mit den Befunden, die beim Studium der Einwirkung von Chloropromazin auf den Blutzucker erhoben wurden (Wynn, 1954; Bamdas u. Mitarb., 1955; Lindaur, 1956). Es wurde nämlich von Bamdas u. Mitarb. Hyperglykämie nach Verabreichung von Chloropromazin festgestellt, deren Höhe der Dosis von

Chloropromazin entsprach. Ebenso wurde eine verzögerte Glucoseresorption bewiesen. Was die Fettresorption und ihre Herabsetzung nach Applikation von Chloropromazin anbelangt, so ist es wahrscheinlich, daß hier wiederum ein bedeutender Faktor eine verminderte Durchblutung und ein trägerer Blutkreislauf im Splanchnicusgebiet ist, was von Bamdas u. Mitarb. im Jahre 1956 experimentell gezeigt wurde. Als ein nicht weniger wichtiger Faktor kann auch die Herabsetzung des Tonus und Hemmung der spontanen Darmmotilität bezeichnet werden, worauf von Lamarche u. Arnould hingewiesen wurde. Es ist ferner möglich, daß sich als untergeordneter Faktor auch die direkte Einwirkung von Chloropromazin auf die Aktivität der Fermente geltend macht. Aus den vorläufigen Resultaten der Arbeit von Cerhová u. Šídlová (aus unserem Institut), welche an anderer Stelle veröffentlicht werden wird, geht hervor, daß durch Einwirkung von Chloropromazin die Aktivität der Darmlipasen (in vitro und auch in vivo) herabgesetzt wird. Durch unsere Ergebnisse wäre es möglich, Laborits Behauptung zu erklären, welche von Neuwirt u. Braun (1956) bewiesen wurde, daß es nämlich ziemlich bald nach Verabreichung von Chloropromazin zu einer negativen Stickstoffbilanz kommt, obwohl die Nahrungsaufnahme normal bleibt. Ist nämlich die Resorption der aufgenommenen Fette und Kohlenhydrate verzögert und höchstwahrscheinlich herabgesetzt, so werden die entweder aufgenommenen oder dem Organismus eigenen Eiweißstoffe in weit größerem Maße zur Energiequelle, als unter normalen Verhältnissen.

Zusammenfassung

Wir verfolgten die Einwirkung von Chloropromazin auf den Fettgehalt im Blutserum und auf die Resorption von Fetten bei Hunden.

Dabei haben wir festgestellt:

1. Chloropromazin selbst erhöht den Fettgehalt im Blutserum.

2. Das vor der Verabreichung von Fetten applizierte Chloropromazin verzögert bedeutend die Resorption der aufgenommenen Fette.

Literatur

Bamdas, B. S., G. D. Glod, L. I. Lando, A. P. Levkovič, G. K. Tarasov u. I. N. Chazen: Žurnál névropatologii i psichiatrii im. Korsakova, Moskva **56**, 121—138 (1956). — Laborit, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 41—58 (1954). — Lamarche, M., et P. Arnould: C. r. Soc. Biol. (Paris) **148**, 565—567 (1954). — Lindaur, V.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 253—257 (1956). — Mundeleer, P.: Anesthesiology **10**, 448 (1953). — Neuwirt, J., u. T. Braun: IV. Tagung der tschechoslowakischen Physiologen, Pharmakologen u. Biochemiker. ČSR. 1956. — Swahn, B.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. **9**, 5 (1953). — Wynn, V.: Lancet **267**, 575 (1954).

Dr. V. Lindaur, Physiolog. Institut der med. Fakultät der Karls-Universität, Pilsen/ČSR, Lidická tr. 1

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 178—193 (1957)

Aus dem Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Arbeitsbereich Biochemie (Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Lohmann)

Die Kinetik der Umsetzung von Oestron und Oestradiol-17β durch Hefe* **

Von

Kurt Repke

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. November 1956)

Die Fähigkeit der Hefezelle, Oestron in das etwa 10mal stärker oestrogen wirksame Oestradiol-17β umwandeln zu können, ist mehrfach beschrieben worden (H. v. Euler u. Zondek, Mamoli, Wettstein, Zondek u. Sulman). Die pharmazeutische Industrie hat sich entsprechende Verfahren zur phytochemischen Darstellung von Oestradiol-17β patentieren lassen (Schering AG., Ciba). In allen Veröffentlichungen wurde die Umsetzung mit der Gärung der Hefe in Zusammenhang gebracht. Die Reaktion ist jedoch anscheinend bisher nicht eingehender untersucht worden. Dabei bietet die Hefezelle nach den Feststellungen dieser Arbeit den seltenen Vorzug, daß sie die untersuchten Umsetzungen ohne unkontrollierbare Nebenreaktionen und mit einer gewissen Spezifität bewerkstelligt. In Fortsetzung der Untersuchungen über den Stoffwechsel der natürlichen Oestrogene wird daher hier über die Kinetik der Umsetzungen von Oestron und Oestradiol-17β durch Hefen berichtet.

Methoden und Materialien

Hefen. Für die meisten Versuche wurde die käufliche Bäckerhefe des „VEB Backhefe Görlitz" benutzt. Es handelte sich dabei um eine Brennerei-Mischhefe, die aus drei verschiedenen Stämmen vom Saccharomyces-Typ zusammengesetzt war. Die in die Untersuchung mit einbezogenen Brauerei-Hefen stammten von der Kindl-Brauerei, Berlin-Weißensee (Stamm A) und von der Schultheiß-Brauerei, Berlin, Schönhauser Allee (Stamm N). Die Torulopsis (Stamm S) wurde uns von Prof. Windisch (Abteilung Mikrobiologie dieses Instituts) überlassen und auf Bierwürze unter Dauerbelüftung gezüchtet. Die Brauerei-Hefen und die Torulopsis wurden vor der Benutzung auf der Zentrifuge gewaschen. — Eine Verarmung der Bäckerhefe an Metaboliten wurde durch 7—14tägiges Belüften geeigneter Suspensionen erhalten. Die Trockengewichte der Hefen wurden nach 15stündiger Erhitzung bei 105° C bestimmt. Die Homogenität der herzustellenden Suspensionen

* Herrn Prof. Dr. G. Katsch zum 70. Geburtstag gewidmet.

** Auszugsweise vorgetragen auf dem XX. Internationalen Kongreß für Physiologie am 2. August 1956 in Brüssel.

wurde durch vorsichtiges Anreiben der Hefen im Mörser gesichert, wobei als Medium, soweit nicht anders angegeben, m/10-Phosphatpuffer ($p_H = 7$) diente.

Steroide. Die von der Schering AG. (Berlin/West) gelieferten Steroide wurden ohne weitere Reinigung benutzt, nachdem sie sich bei der Papierchromatographie, im Schwefelsäurechromogen-Spektrum und bei den speziellen Bestimmungsverfahren (siehe unten) als praktisch einheitlich erwiesen hatten. Als Lösungsmittel für die Steroide wurde Pyridin benutzt. Äthanol und Methanol, die wegen ihrer relativen Unschädlichkeit für die Zelle gern verwandt werden, wurden als Lösungsmittel verlassen, da sie als Metaboliten die Kinetik beeinflußten. Diesen Nachteil besaß Pyridin nicht. Infolge seines hervorragenden Lösungsvermögens für die Steroid-Oestrogene konnte dessen Konzentration in den Hefesuspensionen gewöhnlich mit 0,2% weit unter der Grenze von 2,5% gehalten werden, bei der eine Hemmung der Umsetzungen nachweisbar wurde.

Inkubation. Gewöhnlich wurden 25 ml-Erlenmeyer mit 0,01 ml der pyridinischen Oestrogen-Lösung (25 γ) und 5 ml der Hefesuspension (30 mg Trockengewicht Hefe) beschickt und nach Verschluß mit Schliffstopfen in einem Wasserthermostaten bei 37.5° C geschüttelt. Bei Einsatz großer Steroid-Mengen wurde auch mit 20 ml Hefesuspension (120 mg Trockengewicht Hefe) in 100 ml-Erlenmeyern inkubiert. Zur Vermeidung bakterieller Infektionen wurden bei langdauernder Bebrütung Penicillin und Streptomycin zugesetzt. Bei den Versuchen über den Einfluß des Sauerstoff-Partialdrucks wurde während der Inkubation reinster Stickstoff oder Sauerstoff durch die Suspension geleitet. Die fermentativen Umsetzungen wurden durch dreiminutiges Eintauchen in ein siedendes Wasserbad unterbrochen. Neben den eigentlichen Versuchsansätzen liefen Ansätze mit inaktivierter Hefe und bekannter Steroidmenge und Ansätze mit Hefe ohne Steroidzusatz, welche alle in gleicher Weise behandelt und extrahiert wurden. Letztere lieferten bei den verschiedenen Bestimmungsverfahren die benötigten Bezugs- und Korrekturwerte.

Extraktion. Je nach Menge des Inkubats wurde die Extraktion in 60 ml- oder 240 ml-Scheidetrichtern zylindrischer Form ($\varnothing$ 2 cm oder 4 cm) durch Ausschütteln auf der Maschine (Frequenz: 120/min, Exkursion: 13 cm) ausgeführt. Als Lösungsmittel wurde dabei auf Grund entsprechender Untersuchungen Tetrachlorkohlenstoff gewählt, da mit ihm die reinsten Extrakte erhalten wurden. Die üblichen fettähnlichen Dichtungsmittel (auch Silicon„fett") erwiesen sich für die Dichtung der Schliffe als ungeeignet, da sie mit in die CCl_4-Phase übergingen und die weitere Aufarbeitung, insbesondere die Ketosteroid-Bestimmung, störten. Daher wurden nur so gut eingeschliffene Küken und Stopfen benutzt, daß Wasser als Dichtung genügte. Zur Sicherung einer praktisch quantitativen Extraktion und zur Vermeidung einer Emulsionsbildung wurde das Verhältnis zwischen wäßriger Phase und CCl_4 wie 1 : 3 gehalten. Im einzelnen wurde so vorgegangen, daß in die mit der abgemessenen Menge CCl_4 gefüllten Scheidetrichter die Inkubate mit Hilfe von Wasser quantitativ überführt wurden. Zum Zwecke der vollständigen Extraktion der Oestradiole wurde dann die wäßrige Phase noch mit konzentrierter Salzsäure angesäuert, so daß eine etwa 0,1 n Lösung entstand. Nach je fünfminutigem Schütteln und Absetzenlassen wurde die reine CCl_4-Phase in passende Destillierkölbchen abgelassen und darauf mit der gleichen Menge CCl_4 die ganze Prozedur wiederholt. Der Tetrachlorkohlenstoff wurde auf kleiner Flamme (Mikrobrenner) bis auf einen geringen Rest abdestilliert, der unter vorsichtigem Erwärmen der Kölbchen im Wasserdampf (Gefahr des Verspritzens) mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt wurde. Schwerflüchtige Verbindungen im Rückstand, welche die Ketosteroid-Bestimmung störten, wurden durch Anlegen eines Pumpenvakuums an die Kölbchen unter gleichzeitigem Erhitzen auf dem siedenden Wasserbad während

1 min vertrieben. Mit Hilfe dieses Extraktionsverfahrens wurden im Durchschnitt 95% des eingewogenen Steroids wiedergefunden.

Biologische Bestimmung. Der benutzte Allen-Doisy-Test erlaubte eine qualitative Differenzierung zwischen den in Frage kommenden Oestrogenen, da Oestradiol-17β etwa zehnmal aktiver als Oestron und etwa 40 mal aktiver als Oestradiol-17α ist. Die geübte Technik wurde schon früher beschrieben (Repke u. Markwardt, 1954).

Bestimmung von Oestron. Am geeignetsten erwies sich eine von Wendland u. Lohmann angegebene Modifikation der bekannten Ketosteroid-Bestimmungsmethode mit m-Dinitrobenzol (Zimmermann). Dabei wird statt Äthanol Pyridin als Lösungsmittel für die Farbentwicklung benutzt. Die größte Empfindlichkeit, Schnelligkeit und Sicherheit der Methode wurde bei folgendem Vorgehen gefunden. Die bis 25 γ Oestron enthaltenden Extraktionsrückstände wurden in je 2,0 ml (Eichpipette) einer 0,5%igen Lösung von m-Dinitrobenzol in Pyridin aufgenommen und die Lösung in passende Reagensgläser überführt. Nach Zusatz von je 0,05 ml 1n NaOH, wonach die rote „Leerfarbe" (vgl. Wendland u. Lohmann) auftreten mußte, wurden die Gläser mit Schliffstopfen verschlossen und 60 min bei 50°C gehalten, wonach die Farbentwicklung beendet war. Die „Leerfarbe" wurde durch Zusatz eines Schüppchens Borsäure ausgelöscht und die blaue Ketonfarbe (Absorptionsmaximum bei 580—590 mμ) in 1 cm-Cuvetten spektrophotometrisch (Hg-Linie 578 mμ) bestimmt. Die Benutzung einer Eichkurve zur Bestimmung des jeweiligen Oestron-Gehalts erwies sich wegen einer von der benutzten Hefe und den verwandten Lösungsmitteln abhängigen Schwankung der Bezugsgrößen nicht als zweckmäßig. Statt dessen wurde zur Berechnung des Oestron-Gehalts aus der optischen Dichte ein jeweils neu bestimmter Bezugswert benutzt, der nach Extraktion einer bekannten Menge Oestron aus einer inaktivierten Hefesuspension in analoger Weise wie die eigentlichen Versuchswerte durch Farbentwicklung mit dem Rückstand gewonnen wurde. Vor der Berechnung waren jedoch die erhaltenen optischen Dichten noch einer Korrektur zu unterwerfen, da mit der benutzten Methode auch weitere Verbindungen erfaßt wurden, welche — aus der Hefe und den benutzten Lösungsmitteln stammend — den gesuchten Oestronwert überhöhten. Dieser Korrekturwert wurde nach Extraktion einer entsprechenden Hefesuspension ohne Steroidzusatz durch Farbentwicklung mit dem Extraktionsrückstand jeweils bestimmt und abgezogen. – Die Streuung bei den durchgängig vorgenommenen Doppelbestimmungen betrug maximal 0,5 γ, lag jedoch in der Regel unter 0,1 γ. Eine geübte Person vermochte Extraktion und Ketosteroid-Bestimmung einer Versuchsserie mit 12 Ansätzen innerhalb von 5—6 Std auszuführen, wobei noch Nebenarbeiten verrichtet werden konnten. Der Arbeit liegen u. a. etwa 250 solcher Serien zugrunde.

Papierchromatographie. Vor der Bestimmung der Oestradiole und der Aufnahme der Schwefelsäurechromogen-Spektren wurden die Extraktionsrückstände papierchromatographisch aufgetrennt. Dazu wurden die Rückstände zunächst aus den Destillierkölbchen mit reichlich Pyridin in kleine Spitzkölbchen überführt, das Pyridin vertrieben und der Rückstand erneut, doch diesmal mit einer kleinen abgemessenen Menge Pyridin aufgenommen, welche sich bequem auf das Chromatogramm auftragen ließ. Pyridin wurde vor den sonst üblichen Lösungsmitteln (Äthanol, Methanol, Benzol) bevorzugt, weil infolge seines vielfach höheren Lösungsvermögens (vgl. Doisy u. Mitarb.) das benötigte Lösungsmittel-Volumen sehr viel kleiner gehalten werden konnte. Ein weiterer Vorteil des Pyridins war die geringere Flüchtigkeit, welche ein exaktes Abmessen kleinster Volumina gestattete. – Das Papier (Schleicher & Schüll, 2043bM) wurde in fünf 2 cm-Streifen oder bei Auftrennung größerer Steroidmengen in zwei 6 cm- und einen 1 cm-Streifen von je

48 cm Länge mit gemeinsamem Kopf zerschnitten (vgl. Burton u. Mitarb. und Rubin u. Mitarb.) und 48 Std mit Methanol am Soxhlet extrahiert (vgl. Mitchell u. Davies). Nach Imprägnierung mit einer 1 : 1-Mischung von Propylenglykol und Methanol und 15minutigem Hängenlassen an der Luft wurden die in Pyridin gelösten Rückstände innerhalb eines 2 mm breiten Streifens auf die Chromatogramme aufgetragen. Dabei waren diese mit Glasplatten bis auf den schmalen Auftragungsbezirk abgedeckt, welcher von Warmluft bestrichen wurde. Vor der absteigenden Entwicklung des Chromatogramms mit Toluol als mobiler Phase (vgl. Burton u. Mitarb.) wurde das Zurückfließen des Propylenglykols in die von der Warmluft bestrichen gewesenen Bereiche abgewartet. Nach einer dem jeweiligen Trennungsziel angepaßten Laufdauer wurden die Chromatogramme mit Hilfe von Warmluft getrocknet. Die zur Positionsbestimmung vorgesehenen Streifen wurden mit dem von Barton u. a. angegebenen Phenolreagens behandelt, welches eine blaue Farbe mit allen Steroid-Oestrogenen gab (vgl. Axelrod). Zur Positionsbestimmung der Oestradiole und zur qualitativen Differenzierung zwischen der α- und der β-Verbindung wurde auch die Fluorescenz-Reaktion auf dem Papier nach Neher u. Wettstein benutzt. — Die auf Grund der Positionsbestimmung für die Eluierung vorgesehenen Streifenanteile wurden in kleine Stücke zerschnitten und dann mit Pyridin in einer Vorrichtung eluiert, die im Prinzip der von Axelrod vorgeschlagenen entsprach. Das zum Eluieren benutzte Pyridin wurde in Reagensgläsern gesammelt, welche die für die anschließend benutzten Bestimmungsverfahren benötigten Abmessungen besaßen und das Pyridin daraus durch Absaugen unter Erhitzen auf dem siedenden Wasserbad vertrieben. Gleichzeitig mit den oestrogenhaltigen Papieranteilen wurden gleichgroße ohne Oestrogengehalt eluiert. Diese wurden in gleicher Position wie die oestrogenhaltigen aus einem mitgelaufenen Chromatogrammstreifen entnommen, auf dem ein korrespondierender Extraktionsrückstand aus Hefe ohne Steroidzusatz entwickelt worden war. Diese Eluate dienten nach entsprechender Behandlung bei den nachfolgend zitierten, optischen Methoden zur Kompensation des jeweiligen „background".

Bestimmung von Oestradiol-17β[1]. Für dessen quantitative Bestimmung erwies sich das von Haenni angegebene Verfahren A in allen Einzelheiten als zweckmäßig und zuverlässig.

Bestimmung von Oestradiol-17α[1]. Zum Zwecke einer Empfindlichkeitssteigerung wurde nur die Hälfte der von Haenni angegebenen Reagentienmengen des Verfahrens B benutzt.

Schwefelsäure-Chromogen-Spektren. Bei der von Umberger u. Curtis angegebenen Prozedur erwies sich als zweckmäßig, die mit Oestrogen und verdünnter „90%iger" Schwefelsäure beschickten Reagensgläser während der 12minutigen Erhitzungsperiode mit Gummifingerlingen verschlossen zu halten.

Reagentien. Tetrachlorkohlenstoff und Toluol wurden durch Schütteln mit konzentrierter Schwefelsäure und nach Abtrennen der Schwefelsäure durch fraktionierte Destillation gereinigt. Tetrachlorkohlenstoff wurde vor der Destillation noch solange mit Wasser gewaschen, bis die wäßrige Phase nicht mehr sauer reagierte. — Das für die Ketosteroid-Bestimmung zu benutzende Pyridin mußte soweit gereinigt sein, daß es bei der beschriebenen Farbentwicklung mit 0,5%igem m-Dinitrobenzol, gegen Wasser bei 1 cm Lichtweg gemessen, eine optische Dichte von maximal 0,05 besaß. Bei dem Pyridin p. a. von Merck genügte dazu eine Semicarbazid-Behandlung mit anschließender Vakuumdestillation. Bei den weniger stark vorgereinigten Handelspyridinen mußten zuvor noch weitere Reinigungsschritte vorgenommen werden. Nach fraktionierter Destillation an einer etwa 1,5 m

[1] Nach der Nomenklatur von L. F. u. M. Fieser.

langen Kolonne wurde das zu reinigende Pyridin durch Zugabe eines leichten Überschusses an verdünnter Schwefelsäure in Pyridinsulfat überführt und einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Das mit KOH freigesetzte und getrocknete Pyridin wurde dann vor dem schon beschriebenen letzten Reinigungsschritt noch zur Abtrennung der im Pyridin gelösten KOH im Vakuum destilliert. Weitere Reinigungsverfahren werden von Wendland u. Lohmann angegeben. — m-Dinitrobenzol wurde aus Alkohol umkristallisiert.

Versuchsergebnisse

I. Versuche mit Oestron

Bei Inkubation von Oestron mit Hefezellen verschwanden in zunehmendem Umfang die für das Molekül charakteristischen Ketogruppen. Das konnte an Hand der Farbreaktion mit m-Dinitrobenzol leicht verfolgt werden. Umständlicher war die Identifizierung und quantitative Bestimmung des Umsetzungsprodukts. Auf folgenden Wegen konnte jedoch nachgewiesen werden, daß das Produkt ausschließlich aus Oestradiol-17β besteht. Im Allen-Doisy-Test entfaltete das Produkt diejenige biologische Aktivität, die bei annähernd vollständiger Hydrogenierung von Oestron zu Oestradiol-17β erwartet werden konnte. Auf dem Papierchromatogramm verhielt sich das Produkt sowohl der Position wie den Fluorescenz-Eigenschaften nach wie Oestradiol-17β. Die Schwefelsäurechromogen-Spektren des Produkts und authentischen Oestradiol-17β stimmten überein (vgl. Abb. 1). Bei quantitativen Bestimmungen wurden als Produkt diejenigen Mengen Oestradiol-17β gefunden, die nach den verschwundenen Anteilen Ketosteroid erwartet werden mußten. Mit der entsprechenden spezifischen Farbreaktion, welche bis 0,2 γ herab zu erfassen gestattete, wurde in Produktmengen bis 150 γ kein Oestradiol-17α gefunden. Ein etwaiger Anteil des α-Epimeren am Produkt konnte also nur unter 0,2% gelegen haben. Innerhalb der eingehaltenen Versuchszeiten war ein Steroid-Abbau nicht nachweisbar. — Nach allem bestand

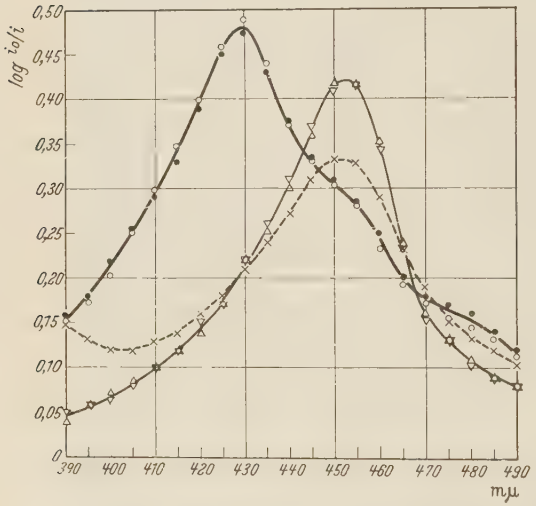


Abb. 1. Schwefelsäurechromogen-Spektren nach Umberger u. Curtis. Je 5 γ/ml authentischen Oestradiol-17β (• —— •), Produkt der Oestron-Reduktion (○——○) und authentischen Oestradiol-17α (× ····· ×). Je 4 γ/ml authentischen Oestron (△ ····· △) und Produkt der Oestradiol-17β-Dehydrogenierung (▽ ——— ▽). d = 1 cm

der chemische Charakter der untersuchten Umsetzung also darin, daß Oestron von den Hefezellen zu Oestradiol-17β hydrogeniert wurde. Diese Feststellung gestattete, die Kinetik der Umsetzung vorwiegend an Hand der schnell auszuführenden Ketosteroid - Bestimmung zu verfolgen und aus den gefundenen Werten die gebildete Menge Oestradiol-17β zu errechnen.

Der kinetischen Analyse waren durch die bekannte schlechte Wasserlöslichkeit der Steroid-Oestrogene Grenzen gesetzt. Nur soweit wie eine vollständige Löslichkeit im Inkubat gewährleistet war, bestand eine direkte Proportionalität zwischen Substratmenge (Oestron) und Reaktionsgeschwindigkeit (vgl. Abb. 2). Infolge seiner unausweichlich geringen Konzentration wurde das Substrat bei Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Hefemenge und Umsatz mehr oder weniger schnell zum limitierenden Faktor (vgl. Abb. 3). Das Temperaturoptimum lag bei 45°C (vgl. Abb. 4). — Auf Grund dieser Ergebnisse wurden als Standardbedingungen bei den weiteren Untersuchungen

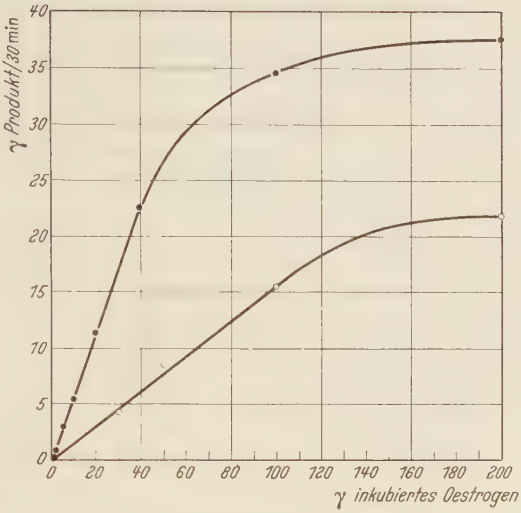


Abb. 2. Umsatz steigender Oestrogenkonzentrationen bei gleichbleibender Hefemenge (30 mg Trockengewicht). Obere Kurve (•——•): auf der Abszisse sind die eingesetzten Oestronmengen/5 ml Hefesuspension und auf der Ordinate die gebildeten Mengen Oestradiol-17β abgetragen. — Untere Kurve (○——○): auf der Abszisse die eingesetzten Mengen Oestradiol-17β/3 ml Hefesuspension, auf der Ordinate die gebildeten Mengen Oestron. Inkubation: 30 min bei 37,5° C

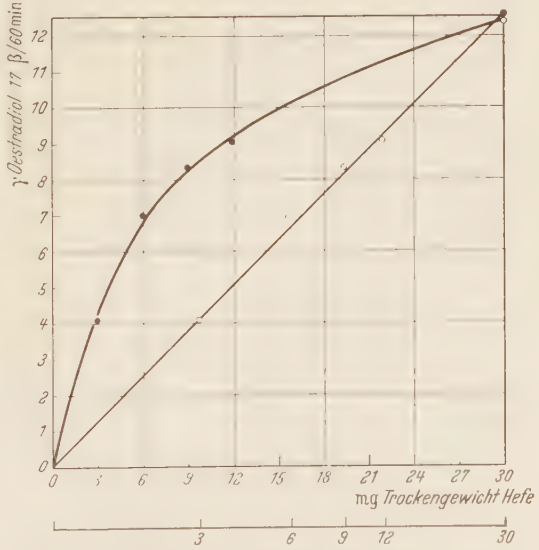


Abb. 3. Umsatz von 20 γ Oestron durch steigende Hefemengen, die jeweils auf 3 ml suspendiert sind. Obere Kurve (•——•) in normalem, untere (○——○) in logarithmischem Maßstab. Inkubation: 30 min bei 37,5° C

Tabelle 1. *Einfluß gewisser Variationen der Standardbedingungen (s. Text) auf die Geschwindigkeit der Reduktion von 25 γ Oestron durch Bäckerhefe (30 mg Trockengewicht)*

Vers. Nr.	Variation (angegeben sind Endkonzentrationen)	Oestradiol-17β/30 min γ	Hemmung Förderung %
1	Stickstoff-Atmosphäre	10,2	0
	Sauerstoff-Atmosphäre	13,7	+ 34
2	m/20 Pyrophosphat/HCl-Puffer[1] p_H 4,0	13,3	+ 2
	p_H 6,7	13,0	0
	p_H 9,6	12,1	— 7
3	frische Hefe	10,1	0
	verarmte Hefe	8,7	— 14
4	verarmte Hefe ohne Metabolit	9,3	0
	verarmte Hefe mit Glucose 5×10^{-2} molar	12,8	+ 38
	verarmte Hefe mit Äthanol 5×10^{-2} molar	15,0	+ 61
	verarmte Hefe mit Saccharose 5×10^{-2} molar	15,3	+ 65
5	frische Hefe mit Äthanol 2×10^{-1} molar	10,4	0
	frische Hefe mit Äthanol 8×10^{-1} molar (≅ 5%)	10,6	+ 2
	frische Hefe mit Äthanol 1,6 molar (≅ 10%)	6,8	— 35
	frische Hefe mit Äthanol 2,5 molar (≅ 15%)	2,6	— 75
	Acetaldehyd, 2,5 molar	1,6	— 85

[1] Am Ende der Inkubation wurden p_H 5,4, 6,8 und 9,0 gemessen.

Tabelle 2. *Geschwindigkeit der Reduktion von 25 γ Oestron durch Bäckerhefe (30 mg Trockengewicht) nach 20minutiger Vorinkubation mit verschiedenen Hemmstoffen*

Vers. Nr.	Ferment-Hemmstoff (molare Endkonzentration)	Oestradiol-17β/30 min γ	Hemmung Förderung %
6	Hefesuspension (p_H 4) ohne Hemmstoff	11,8	0
	Hefesuspension mit NaF 2×10^{-2}	7,1	— 40
	Hefesuspension mit NaF 2×10^{-1}	2,5	— 79
7	Hefesuspension (p_H 5,6) ohne Hemmstoff	12,4	0
	Hefesuspension mit Jodessigsäure 1×10^{-3}	11,2	— 10
	Hefesuspension mit Jodessigsäure 1×10^{-2}	6,2	— 50
8	ohne Hemmstoff	13,1	0
	mit Cyanid 1×10^{-3}	6,1	— 53
	mit Cyanid 1×10^{-2}	3,3	— 75
	mit Cyanid 1×10^{-1}	1,9	— 85
9	ohne Hemmstoff	10,6	0
	mit p-Benzochinon, $7{,}5\times10^{-4}$	0,9	— 91
10	ohne Hemmstoff	13,3	0
	mit 2,4-Dinitrophenol 1×10^{-5}	15,0	+ 13
	mit 2,4-Dinitrophenol 1×10^{-4}	13,8	+ 4
	mit 2,4-Dinitrophenol 1×10^{-3}	11,5	— 13
11	ohne Hemmstoff	13,7	0
	mit 4,6-Dinitro-o-Kresol, 1×10^{-3}	11,5	— 26

25γ Oestron mit 5 ml Hefesuspension (30 mg Trockengewicht Hefe) 30 min bei 37,5° C in Luftatmosphäre inkubiert. Unter diesen Bedingungen wurden je nach Alter und sonstiger Beschaffenheit der Hefe etwa 50% des eingesetzten Oestron hydrogeniert.

In Sauerstoff-Atmosphäre verlief die Oestron-Reduktion schneller als in Stickstoff-Atmosphäre (vgl. Tab. 1, Versuchsbeispiel 1). Bei starke Variation der Wasserstoffionen-Konzentration im Suspensionsmedium ließ sich nachweisen, daß mit zunehmender Alkalinität eine geringe Hemmung der Reaktionsgeschwindigkeit eintritt (vgl. Versuchsbeispiel 2). Der Einfluß von Metaboliten auf die Kinetik hing vom Zustand der benutzten Hefe ab. Bei Einsatz von frischer Hefe wurde ein fördernder Einfluß, wenn überhaupt, erst nach über 30 min fortgesetzter Inkubation deutlich. Mit brennstoff-verarmter Hefe ließ sich die gegenüber frischer Hefe verzögerte Oestron-Hydrogenierung (vgl. Versuchsbeispiel 3) durch Zugabe verschiedener Metaboliten bedeutend steigern. Am wirksamsten erwiesen sich Glucose, Saccharose und Äthanol

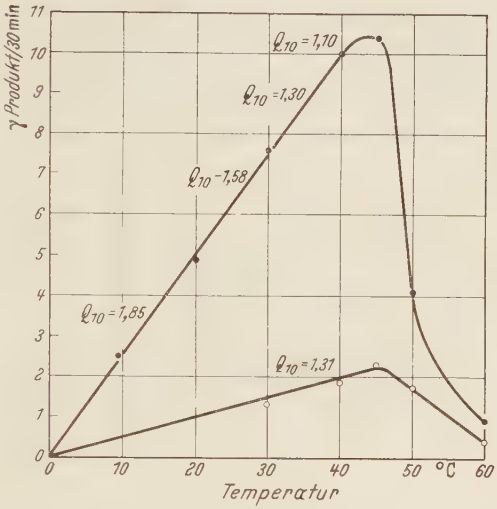


Abb. 4. Lage der Temperatur-Optima der Oestron-Reduktion (•——•) und der Oestradiol-17β Dehydrogenierung (○——○) bei Inkubation von je 20γ Oestron oder je 25 γ Oestradiol-17β mit gleicher Hefemenge (30 mg Trockengewicht). Inkubation 30 min

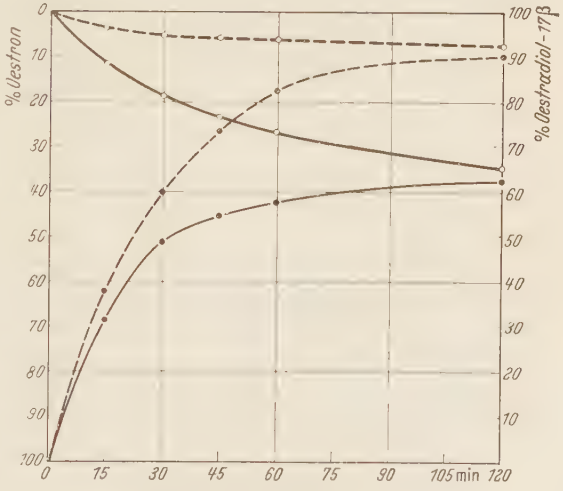


Abb. 5. Einstellung der Gleichgewichte bei Inkubation von je 25 γ Oestron oder Oestradiol-17β mit nährstoffverarmter Hefe. Verlauf der Oestradiol-17β-Dehydrogenierung (○– – –○) und Oestronreduktion (•– – –•) mit Äthanolzusatz (5×10^{-2} molar) und der Dehydrogenierung (○——○) und Reduktion (•——•) ohne Metaboliten-Zusatz

vgl. Versuchsbeispiel 4). Hohe Konzentrationen Äthanol oder Acetaldehyd wirkten hemmend (vgl. Versuchsbeispiel 5). Alle untersuchten Ferment-Hemmstoffe verzögerten, meist erst in relativ hoher Konzentration, die Oestron-Reduktion. Als wirksamster Hemmstoff zeigte sich p-Benzochinon (vgl. Tab. 2).

II. Versuche mit Oestradiol-17β

Bei Inkubation von Oestradiol-17β mit Hefezellen traten Ketogruppen auf, welche die gleiche Farbreaktion mit m-Dinitrobenzol wie die des Oestron gaben. Tatsächlich handelte es sich dabei um Oestron.

Tabelle 3. *Einfluß gewisser Variationen der Standardbedingungen auf die Geschwindigkeit der Oestradiol-17β-Dehydrogenierung*[1] *durch Bäckerhefe (30 mg Trockengewicht)*

Vers. Nr.	Variation (angegeben sind Endkonzentrationen)	Oestron γ	Hemmung Förderung %
12	frische Hefe ohne Metabolit	2,9	0
	verarmte Hefe ohne Metabolit	5,6	+ 93
	verarmte Hefe mit Äthanol (3×10^{-1} molar)	2,5	— 14
13	frische Hefe ohne Metabolit	2,3	0
	frische Hefe mit Äthanol (2×10^{-1} molar)	0,8	— 65
	frische Hefe mit Saccharose (2×10^{-1} molar)	2,6	+ 13
	frische Hefe mit Glucose (2×10^{-1} molar)	3,7	+ 61
14	Luft-Stickstoff-Atmosphäre ohne Metabolit	0,9	0
	Luft-Stickstoff-Atmosphäre ohne Metabolit	0,0	— 100
	Luft-Stickstoff-Atmosphäre mit Glucose (2×10^{-1} molar)	3,4	+ 278
	Luft-Stickstoff-Atmosphäre mit Glucose (2×10^{-1} molar)	4,9	+ 445
15	m/20 Pyrophosphat/HCl-Puffer[2] p_H 4,0	11,1	— 10
	m/20 Pyrophosphat/HCl-Puffer[2] p_H 6,7	12,3	0
	m/20 Pyrophosphat/HCl-Puffer[2] p_H 9,6	16,0	+ 30
16	Oestradiol-17β	12,8	—
	Oestradiol-17α	0,0	—

[1] In den Versuchen 12—14 sind 25 γ 15 min und in den Versuchen 15—16 sind 100 γ 30 min inkubiert worden.

[2] Am Ende der Inkubation wurden p_H 5,8, 6,9 und 9,0 gemessen.

Zur Identifikation des Produkts wurde Oestradiol-17β mit verarmter Hefe inkubiert, da hierbei der Prozensatz an gebildetem Oestron wesentlich höher lag als mit frischer Hefe (vgl. Versuchsbeispiel 12 in Tab. 3). Das Produkt verhielt sich bei papierchromatographischer Auftrennung wie Oestron und zeigte ein mit Oestron identisches Schwefelsäurechromogen-Spektrum (vgl. Abb. 1). Die Hefezellen vermochten also Oestradiol-17β zu Oestron zu dehydrogenieren. Die Geschwindigkeit der Umsetzung war bei gleichbleibender Hefemenge innerhalb der Löslichkeitsgrenzen des Steroids der Konzentration an Oestradiol-17β direkt

proportional (vgl. Abb. 2). Durch Steigerung der Hefemenge bei gleichbleibender Oestradiol-17β-Konzentration wurde der Umsatz in gleicher Weise wie beim Oestron beeinflußt. Das Temperatur-Optimum der Dehydrogenierung lag wie das der Reduktion bei 45° C (vgl. Abb. 4). Im Hinblick auf diese Übereinstimmungen wurden im folgenden die gleichen Standardbedingungen eingehalten wie beim Oestron.

Tabelle 4. *Geschwindigkeit der Dehydrogenierung von Oestradiol-17β durch Bäckerhefe (30 mg Trockengewicht) nach 20 min Vorinkubation mit verschiedenen Ferment-Hemmstoffen*[1]

Vers. Nr.	Ferment-Hemmstoff (molare Endkonzentration)	Oestron γ	Hemmung Förderung %
17	Hefesuspension (p_H 4) ohne Hemmstoff	2,5	0
	Hefesuspension mit NaF, 2×10^{-2}	1,4	— 44
18	Hefesuspension (p_H 5,6) ohne Hemmstoff	1,6	0
	Hefesuspension mit Jodessigsäure 1×10^{-3}	1,3	— 19
	Hefesuspension mit Jodessigsäure 1×10^{-2}	0,5	— 69
19	ohne Hemmstoff	2,9	0
	mit Cyanid 1×10^{-4}	1,6	— 45
	mit Cyanid 1×10^{-3}	0,8	— 72
	mit Cyanid 1×10^{-2}	0,6	— 80
	mit Cyanid 1×10^{-1}	0,2	— 93
20	ohne Hemmstoff	9,5	0
	mit p-Benzochinon, $7{,}5\times10^{-4}$	7,6	— 20
21	ohne Hemmstoff	8,7	0
	mit 2,4-Dinitrophenol 1×10^{-5}	11,0	+ 26
	mit 2,4-Dinitrophenol 1×10^{-4}	9,5	+ 9
	mit 2,4-Dinitrophenol 1×10^{-3}	8,7	0
22	ohne Hemmstoff	10,2	0
	mit 4,6-Dinitro-o-Kresol, 1×10^{-3}	8,8	— 14

[1] In den Versuchen 17—19 sind 25 γ 15 min und in den Versuchen 20—22 sind 100 γ 30 min inkubiert worden.

Als wesentlich für die Reaktionsgeschwindigkeit erwies sich auch hier der Einfluß von Metaboliten auf den Stoffwechsel der Zellen. Die Begünstigung der Oestradiol-17β-Dehydrogenierung nach Brennstoff-Verarmung ließ sich durch Zusatz von Metaboliten wie Äthanol aufheben (vgl. Versuchsbeispiel 12). Bei Verwendung von frischer Hefe hemmte Äthanol gleichfalls, wirkten aber Saccharose und vor allem Glucose beschleunigend auf die Geschwindigkeit der Oestron-Bildung (vgl. Versuchsbeispiel 13). Der fördernde Effekt der Glucose trat besonders deutlich in Stickstoff-Atmosphäre hervor, in welcher ohne Glucose die Oestradiol-17β-Dehydrogenierung gegenüber Luft-Atmosphäre verlangsamt war (vgl. Versuchsbeispiel 14). Eine Verschiebung der

Wasserstoffionen-Konzentration im Suspensionsmedium zur alkalischen Seite wirkte sich fördernd auf den Umsatz aus (vgl. Versuchsbeispiel 15). Im Gegensatz zu Oestradiol-17β wurde das α-Epimere nicht zu Oestron dehydrogeniert (vgl. Versuchsbeispiel 16). — Eine Reihe untersuchter Fermentgifte hemmte die Oestradiol-17 β-Dehydrogenierung ausnahmslos (Tab. 4), wobei die wirksamen Konzentrationen fast durchweg in derselben Größenordnung lagen wie bei der Oestron-Reduktion (Tab. 2). Nur gegenüber p-Benzochinon erwies sich der Dehydrogenierungsprozeß als relativ unempfindlich. In Konzentrationen, bei denen die Reduktion noch fast vollständig unterdrückt war, wurde die Dehydrogenierung nicht oder nur wenig gehemmt gefunden (vgl. Versuchsbeispiele 9 u. 20).

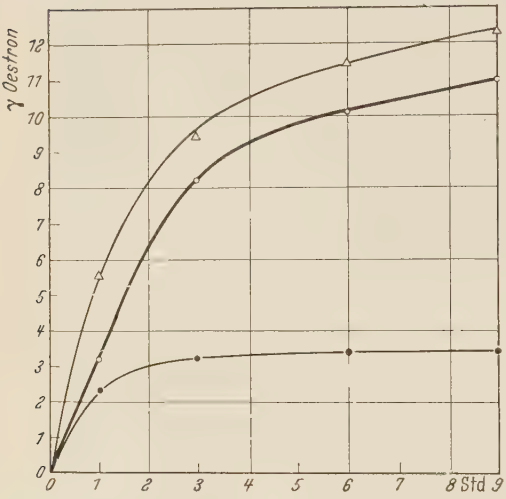


Abb. 6. Einfluß von p-Benzochinon auf den Verlauf der Dehydrogenierung von 25 γ Oestradiol-17β durch Bäckerhefe (jeweils 30 mg Trockengewicht): Verwendung von frischer Hefe ohne Zusatz (•——•) oder mit 5×10^{-4} molarem p-Benzochinon (○——○) und von verarmter Hefe ohne Zusatz (△——△)

III. Versuche über die Gleichgewichts-Einstellung zwischen Oestron und Oestradiol-17β und über die Ordnung der Reaktion

Die beschriebenen Versuchsergebnisse haben erwiesen, daß Hefezellen Oestron in Richtung Oestradiol-17 β und Oestradiol-17 β in Richtung Oestron umzusetzen vermögen. Da eine weitere Teilnahme des jeweiligen Produkts an den Reaktionen nicht verhindert wurde, stellte sich also bei fortgesetzter Inkubation, gleichgültig mit welchem der beiden Steroide gestartet wurde, schließlich ein Gleichgewicht Oestron $\rightleftharpoons$ Oestradiol-17β ein. Die Einstellung dieses Gleichgewichts ließ sich experimentell leicht verfolgen, indem die beiden Steroide getrennt mit Hefe inkubiert und das Verschwinden oder Auftreten von Ketongruppen bestimmt wurden. Dabei zeigte sich, daß die Lage des Gleichgewichts weitgehend durch Steuerung des Stoffwechsels der Hefezellen zu beeinflussen war (vgl. Abb. 5). Das Verhältnis Oestron: Oestradiol-17β wurde nach 180 min Inkubation bei Verwendung frischer Hefe ohne Zusätze wie 18:82 und bei nährstoff-verarmter Hefe ohne Zusätze wie 42:58 gefunden. Durch Zusatz von Metaboliten wie Glucose oder Äthanol ließ es sich in beiden Fällen auf 8 : 92 verschieben. Der Einfluß des Sauerstoff-Partialdrucks auf

die Lage des Gleichgewichts erwies sich als gering; das bezeichnete Verhältnis betrug in Stickstoff-Atmosphäre 9:91 und in Sauerstoff-Atmosphäre 20:80[1]. Auch noch nach beendeter Einstellung des Gleichgewichts konnte sich dessen Lage in Abhängigkeit vom Stoffwechsel verändern. Wenn beispielsweise ohne Zusatz von Metaboliten über diesen Zeitpunkt hinaus inkubiert wurde, dann trat im Verlauf der Inkubation mit dem fortschreitenden Verbrauch an Brennstoff-Reserven eine langsame Wanderung zur Oestron-Seite ein.

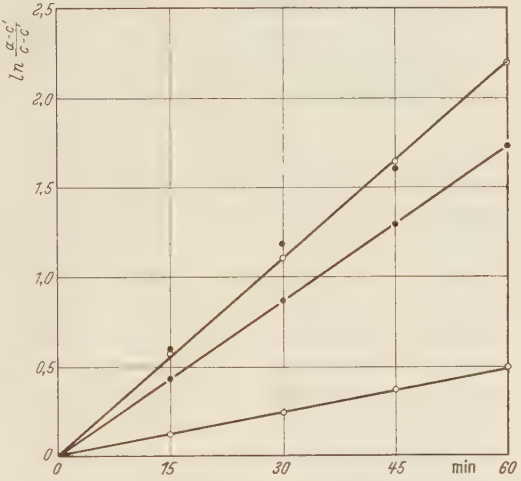


Abb. 7. Bestimmung der Reaktionskonstanten der Oestron-Reduktion (k_1) und der Oestradiol-17β-Dehydrogenierung (k_2) unter Standardbedingungen für frische Hefe mit Hilfe des Ausdrucks $k_1+k_2=\frac{1}{t}\ln\frac{a-c'}{c-c'}$. Darin bedeuten a die Ausgangsmenge, c die jeweilige restliche Menge. c' die Menge des Substrats im Gleichgewicht. Experimentell bestimmt wurden die Summen von k_1 und k_2 (Neigung der oberen Geraden) für die Oestron-Reduktion (•——•) und die Oestradiol-17β-Dehydrogenierung (o——o) und daraus die monomolekularen Reaktionskonstanten errechnet (Neigung der mittleren und unteren Geraden). $k_1 = 2{,}9 \times 10^{-2}\left[\frac{1}{\text{min}}\right]$; $k_2 = 0{,}8 \times 10^{-2}\left[\frac{1}{\text{min}}\right]$

Bei den Versuchen über den Einfluß von p-Benzochinon auf die Steroid-Umsetzungen durch frische Hefe ließen sich Konzentrationen finden, bei denen ausschließlich die Oestron-Reduktion gehemmt war. Dementsprechend stellte sich dann das Gleichgewicht zwischen den beiden Prozessen nicht in der zu erwartenden Lage ein, sondern lief die Oestradiol-17β-Dehydrogenierung bei genügend lange fortgesetzter Inkubation weit darüber hinaus und erreichte das mit verarmter Hefe erreichbare Ausmaß (vgl. Abb. 6). Der beschriebene Effekt des p-Benzochinon auf die Oestron-Bildung ließ sich übrigens bei Verwendung von verarmter Hefe nicht erhalten.

Die Geschwindigkeiten der Oestron-Reduktion wie der Oestradiol-17β-Dehydrogenierung besaßen die Charakteristika von Reaktionen erster Ordnung in bezug auf die Substratkonzentration. Natürlich wurde dies aber nur deutlich, indem bei der Berechnung die jeweilige Rückwärts-Reaktion berücksichtigt wurde (vgl. Abb. 7). — Es wurden keine

[1] Sämtliche Verhältniszahlen stellen Durchschnittswerte dar, die Abweichungen betrugen im Mittel 12%.

Bedingungen gefunden, bei denen der Einfluß der Permeïer-Geschwindigkeit der Steroide auf die Kinetik untersucht werden konnte. Das Fehlen einer umsetzungsfreien Zeit in den ersten Minuten der Inkubation sprach gegen die Bedeutung eines solchen Faktors.

IV. Versuche mit verschiedenen Hefen

Die für die beschriebenen Versuche benutzte Bäckerhefe zeigte sich bezogen auf Trockengewicht allen anderen untersuchten Hefen überlegen. Während zwei Stämme Brauerei-Hefen erst nach unverhältnismäßig langer Inkubation überhaupt Aktivität erkennen ließen, welche

Tabelle 5. *Aktivitätsvergleich zwischen verschiedenen Hefen unter Standardbedingungen (bezogen auf 30 mg Trockengewicht)*

Hefe-Art	Inkubiertes Oestrogen	Inkubationszeit min	Produktmenge γ
Bierhefe (Kindl-Brauerei, Stamm A) ohne Metabolit	je 25 γ Oestron	jeweils 60 min	4,2[a]
Bierhefe mit Glucose (5×10^{-2} molar)			6,2[a]
Bäckerhefe mit Glucose (5×10^{-2} molar)			20,2[a]
Bierhefe (Schultheiß-Brauerei, Stamm N) ohne Metabolit	je 25 γ Oestron	jeweils 60 min	5,4[a]
Bierhefe mit Glucose (5×10^{-2} molar)			9,0[a]
Bäckerhefe ohne Metabolit			18,5[a]
Torulopsis (Stamm S)	je 25 γ Oestron	jeweils 30 min	8,3[a]
Bäckerhefe			11,5[a]
Bierhefe (Kindl-Brauerei, Stamm A)	je 100 γ Oestradiol-17β	jeweils 120 min	4,2[b]
Bäckerhefe			17,4[b]
Torulopsis (Stamm S)	je 100 γ Oestradiol-17β	jeweils 30 min	2,8[b]
Bäckerhefe			10.7[b]

[a] Oestradiol-17β, [b] Oestron.

zudem durch Glucose oder Saccharose nur wenig gesteigert wurde, wies ein unter Dauerbelüftung gewachsener Stamm Torulopsis etwa die Hälfte der Aktivität von Bäckerhefe auf (vgl. Tab. 5). Danach schienen vor allem die gut atmenden Oberhefen das untersuchte Fermentsystem zu besitzen.

Diskussion

Eine hervorragende Bedeutung der Gärung für die Oestron-Reduktion, die nach den in der Einleitung zitierten Arbeiten zu vermuten war, wurde nicht gefunden. Gerade die gut gärenden Unterhefen

(Brauerei-Hefen) zeigten ja bei dieser Untersuchung nur minimale Aktivität im Vergleich zu den gut atmenden Oberhefen (Bäckerhefe, Torulopsis). Weiter konnten die Steroid-Umsetzungen auch bei ausschließlicher Atmung der Hefezellen erhalten werden. Dies traf bei allen Versuchen zu, in denen handelsübliche Bäckerhefe ohne Zusatz von Metaboliten benutzt worden war. Solche Hefen besitzen nämlich Kohlenhydrat-Reserven, welche nicht vergoren werden können, aber die Zellen über viele Stunden zur Aufrechterhaltung einer „endogenen Atmung" befähigen (Stier u. Stannard). Schließlich wurde bei Einleiten von Sauerstoff in die Hefesuspension, wodurch die Gärung unterdrückt wurde, sogar eine Steigerung des Steroid-Umsatzes gefunden.

Nach vorausgegangenen Untersuchungen am Glucose-6-phosphat- und am Glucose-Dehydrogenasesystem (Repke u. Markwardt, 1955; Repke) ist bei der Oestron-Reduktion die Hydrogenierung der Pyridinnukleotide ein entscheidendes Zwischenglied. Der Wasserstoff wird erst dann, vermutlich unter Katalyse eines spezifischen Ferments, auf Oestron übertragen. In dieser Arbeit wurde nun gefunden, daß Oestron von der Hefezelle besonders schnell und vollständig reduziert wird bei reichlichem Angebot an Metaboliten, also unter Bedingungen, bei denen besonders viel reduziertes Pyridinnucleotid anfällt[1]. Bei Verarmung der Hefe an Metaboliten (Wasserstoff-Donatoren) verlief die Oestron-Reduktion langsamer, dagegen trat dann die Oestradiol-17β-Dehydrogenierung hervor, was offenbar eine Folge der verminderten Konzentration an hydriertem Pyridinnucleotid war:

$$\text{Oestron} \underset{\text{DPN}^+ \text{ oder } \text{TPN}^+}{\overset{\text{DPNH} + \text{H}^+ \text{ oder } \text{TPNH} + \text{H}^+}{\rightleftharpoons}} \text{Oestradiol-17}\beta.$$

Danach wäre die Lage des Gleichgewichts zwischen Oestron und Oestradiol-17β von dem stationären Verhältnis, die Umsetzungsgeschwindigkeit von der Wechselgeschwindigkeit zwischen reduziertem und oxydiertem Pyridinnucleotid abhängig. Alle nicht eigens angeführten Beobachtungen dieser Arbeit passen gut zu dieser Vorstellung. — Die Tatsache, daß die H^+-Konzentration in die Reaktionsformel eingeht, erklärt die Beobachtung, daß eine Verschiebung des p_H im Suspensionsmedium auf Umsatz und Gleichgewichtslage von Einfluß war. Dieser Einfluß — Begünstigung der Oestron-Reduktion bei saurem p_H und Förderung der Oestradiol-17β-Dehydrogenierung bei alkalischem p_H — dürfte nur infolge der erheblichen Pufferkapazität der Zelle so verhältnismäßig gering gefunden worden sein.

Die untersuchten Fermentgifte hemmten fast ausnahmslos sowohl die Oestron-Reduktion wie die Oestradiol-17β-Dehydrogenierung in

[1] *Anmerkung bei der Korrektur:* Entsprechende Befunde haben Holzer u. Mitarbeiter erhoben (Zschr. Physiol. Chem. **297**, 1 (1954).

annähernd gleichem Maße, so daß es mit deren Hilfe nicht möglich war, die Reaktionen in eine gewünschte Richtung zu steuern. Eine Ausnahme machte nur p-Benzochinon, das vorzugsweise die Oestron-Reduktion hemmte. Ursache für diese Hemmwirkung war vermutlich eine spontan ablaufende und zugleich fermentativ beschleunigte Abfang-Reaktion des p-Benzochinon mit den reduzierten Pyridinnucleotiden der Hefe:

$$\text{p-Benzochinon} + \text{DPN} \cdot \text{H}_2(\text{TPN} \cdot \text{H}_2) \xrightarrow[\text{Reduktase}^1]{\text{Chinon-}} \text{DPN (TPN)} + \text{Hydrochinon},$$

als deren Folge der Wasserstoff-Donator für die Steroid-Hydrogenierung fehlte.

2,4-Dinitrophenol und 4,6-Dinitro-o-Kresol hemmten, wenn überhaupt, erst in verhältnismäßig hoher Konzentration beide Reaktionen. Danach ist anzunehmen, daß oxydative Phosphorylierungen an den Steroidumsetzungen nicht beteiligt sind. Weiter scheint der Schluß erlaubt, daß die „Oestron-Reduktase" nicht mit der Chinon-Reduktase identisch ist. Denn das letztgenannte Ferment wird durch 2,4-Dinitrophenol schon in solchen Konzentrationen vollständig gehemmt (Wosilait u. Mitarb.), bei denen die Oestron-Reduktion durch Hefe noch beschleunigt gefunden wurde. Dieser Beschleunigungs-Effekt, welcher auch für die Oestradiol-17β-Dehydrogenierung festgestellt wurde, beruht wahrscheinlich auf der bekannten fördernden Wirkung niedriger Konzentrationen 2,4-Dinitrophenol auf die Sauerstoff-Aufnahme.

Aus den Ergebnissen mit den anderen Fermentgiften lassen sich keine weiteren Rückschlüsse auf die Natur des vermuteten Steroid-Ferments gewinnen. Die gefundenen Hemmwirkungen von Fluorid, Jodessigsäure und Cyanid gehen wohl auf ihre Eigenschaft zurück, die „endogene Atmung" der Hefezellen zu unterdrücken (Stier u. Stannard; Runnström u. Sperber). Das Hefe-Ferment besaß, wie schon das unterschiedliche Verhalten der beiden Oestradiol-Epimeren anzeigte, eine sterische Spezifität. Nach weiteren, noch zu publizierenden Versuchen wird nur die β-Konfiguration angegriffen, so daß das Ferment als β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu bezeichnen ist.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Untersuchung wurde gefunden, daß Hefe nicht nur Oestron zu Oestradiol-17β reduziert, sondern auch Oestradiol-17β, nicht dagegen Oestradiol-17α, zu Oestron dehydrogeniert. Die Umsetzungsprodukte wurden durch ihre biologische Aktivität, spezielle Bestimmungsverfahren, papierchromatographisches Verhalten und Schwefelsäurechromogen-Spektren identifiziert. Bei den Versuchen bewährte sich eine neue Modifikation der bekannten Ketosteroid-Bestimmungsmethode mit m-Dinitrobenzol. Der Einfluß der Steroid- oder Hefekonzentration, der Temperatur, des Sauerstoff-Partialdrucks, des pH,

[1] Das Ferment ist in Bäckerhefe von Wosilait u. Mitarb. nachgewiesen worden.

des Entzugs oder Zusatzes von Metaboliten sowie verschiedener Fermentgifte auf die Geschwindigkeit der beiden Prozesse wurde untersucht. Die Versuchsergebnisse zeigten, daß bei der Inkubation der Steroide mit Hefe zwischen Oestron-Reduktion und Oestradiol-17β-Dehydrogenierung ein Gleichgewicht eintritt, dessen Lage sich über den Kohlenhydrat-Stoffwechsel als steuerbar erwies. Für die Geschwindigkeiten der beiden Prozesse wurde gefunden, daß sie die Charakteristika von Reaktionen erster Ordnung in bezug auf die Substratkonzentrationen besitzen. Im p-Benzochinon wurde ein Hemmstoff gefunden, welcher vorzugsweise die Oestron-Reduktion unterdrückt. Damit eröffnete sich ein weiterer Weg, die normale Einstellung des Gleichgewichts zu verhindern und die von der Hefezelle bewirkten Steroidumsetzungen, die unter gewöhnlichen Bedingungen ganz auf der Seite der Oestron-Reduktion liegen, in Richtung Dehydrogenierung von Oestradiol-17β zu steuern. Bei vergleichenden Untersuchungen über die Aktivität verschiedener Hefen erwiesen sich die gut atmenden Oberhefen (Bäckerhefe, Torulopsis) den schlecht atmenden Unterhefen (Brauerei-Hefen) als überlegen. Die Ergebnisse wurden unter dem Gesichtspunkt der Bedeutung von Gärung und Atmung der Zelle und im Hinblick auf den Mechanismus der Reaktionen sowie auf die Natur und Spezifität des vermuteten Steroidferments diskutiert.

Herrn Prof. Dr. Dr. K. Lohmann und Herrn Prof. Dr. E. Negelein habe ich für Anregungen und Hilfe zu danken. Die verständnisvolle Hilfe von Frl. A. Pawlicki bei der Durchführung der Versuche wird dankbar anerkannt.

Literatur

Axelrod, L. R.: Recent Prog. in Hormone Res. **9**, 69 (1954). — Barton, G. M., R. S. Evans and J. A. F. Gardner: Nature (Lond.) **170**, 249 (1952). — Burton, R. B., A. Zaffaroni and E. H. Keutmann: J. of Biol. Chem. **188**, 763 (1951). — Ciba: C **1939** I, 3591. — Doisy jr., E. A., M. N. Huffman, S. A. Thayer and E. A. Doisy: J. of Biol. Chem. **138**, 283 (1941). — Euler, H. v., u. B. Zondek: Biochem. Z. **271**, 64 (1934). — Fieser, L. F., and M.: Natural products related to phenanthrene. New York, Reinhold Publishing Corp. 1949. — Haenni, E. O.: J. Amer. Pharmaceut. Assoc. **39**, 544 (1950). — Mamoli, L.: Ber. **71**, 2696 (1938). — Mitchell, F. L., and R. E. Davies: Biochemic. J. **56**, 690 (1954). — Neher, R., u. A. Wettstein: Helvet. chim. Acta **34**, 2278 (1951). — Repke, K., u. F. Markwardt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 259 und 271 (1954); **224**, 341 (1955). — Repke, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 219 (1955). — Rubin, B. L., R. I. Dorfman and G. Pincus: Recent Progr. in Hormone Res. **9**, 213 (1954). — Runnström, J., u. E. Sperber: Biochem. Z. **298**, 340 (1938). — Schering AG.: C **1939** I, 4089. — Stier, T. J. B., and J. N. Stannard: J. Gen. Physiol. **19**, 461 u. 479 (1936). — Umberger, E. J., and J. M. Curtis: J. of Biol. Chem. **178**, 275 (1949). — Wendland, W., u. K. Lohmann: Biochem. Z. (im Druck). — Wettstein, A.: Helvet. chim. Acta **22**, 250 (1939). — Wosilait, W. D., A. Nason and A. J. Terrell: J. of Biol. Chem. **206**, 271 (1954). — Zimmermann, W.: Z. physiol. Chem. **300**, 141 (1955). — Zondek, B., and F. Sulman: Endocrinology (Springfield, Ill.) **33**, 204 (1943).

Doz. Dr. med. K. Repke, Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch, Lindenberger Weg 70

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 194—204 (1957)

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering A.G., Berlin-West

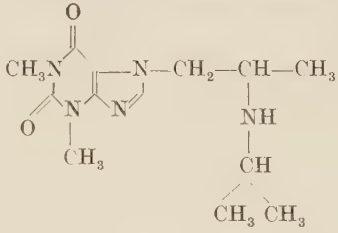
Die chemischen und pharmakologischen Eigenschaften von 7-(β-Isopropylamino-propyl)-theophyllin

Von
E. Busch und H. Langecker

(Eingegangen am 24. November 1956)

Aus einer Reihe von 7-Aminoalkyl-theophyllinen wurde unter Berücksichtigung von Zugänglichkeit, Verträglichkeit und Wirkung 7-(β-Isopropylamino-propyl)-theophyllin[1] ausgewählt und für das Anwendungsbereich des Theophyllins der Klinik empfohlen. Im folgenden werden die chemischen und pharmakologischen Eigenschaften der Verbindung beschrieben.

1. Chemische Eigenschaften



7-(β-Isopropylamino-propyl)-theophyllin, $C_{13}H_{21}O_2N_5 \cdot 3\,H_2O$, Mol.Gew. = 333,3. Die Verbindung bildet farb- und geruchlose, stark bitter schmeckende Kristalle, Fp = 75—78°.

Es lösen sich bei Zimmertemperatur in Wasser 0,1%, in Methanol etwa 50%, in Äthylalkohol etwa 40%, in Benzol etwa 1%, in Äther etwa 0,9% und in Chloroform etwa 25% (g/Vol.).

UV: ε 227 = 6000, ε 274 = 8550 (analog wie Theophyllin). Eine wäßrige Lösung von 0,005 Mol/l hat ein p_H von 10,0, $pk_B = 5{,}8$.

7-(β-Isopropylamino-propyl)-theophyllin-Chlorhydrat (I), $C_{13}H_{21}O_2N_5 \cdot HCl$ Mol.Gew. = 315,8. Die Verbindung bildet farb- und geruchlose, stark bitter schmeckende Kristalle, Fp. = 267—268°.

Es lösen sich bei Zimmertemperatur in Wasser etwa 40%, in Methanol etwa 1,7%, in Äthanol unter 0,5%, in Chloroform etwa 0,4% (g/Vol.).

In Benzol und Äther ist I unlöslich.

UV-Daten sind die der freien Base.

Eine 20%ige wäßrige Lösung hat ein p_H von 5,6.

[1] Die Verbindung wurde im Labor des Herrn Dr. H. Priewe von Herrn Dr. A. Poljak synthetisiert.

I gibt, in salzsaurer Lösung nach Behandeln mit H_2O_2 mit Ammoniak versetzt, rot/violette Töne, nicht aber nach Oxydation mit Salpetersäure. Es verhält sich demnach wie Theophyllin.

Eine 20%ige Lösung des Hydrochlorids wird durch n-HCl bzw. Magensaft nicht gefällt. Sie ist gut verträglich mit quecksilberhaltigen Diuretica und Diamox, sie gibt mit Salyrgan bzw. Novurit im Verhältnis 1:2, ferner mit 5%iger Glucoselösung bzw. 10%igem Ca-thiosulfat keine Trübung. Diamox löst sich in einer 20%igen Lösung des I zu 12,5% in der Wärme.

Nachweis: Eine Lösung der Base (dies gilt auch für andere 7-Aminoalkyl-theophylline) in Benzol bildet mit Bromthymolblau einen gefärbten Komplex, der sich mit Natriumhydroxyd ausschütteln läßt. Soweit keine starken Basen (z. B. Arzneimittel) im Harn vorliegen, läßt sich auf diese Weise I bestimmen.

Reagentien. 1. Benzol einmal mit $^1/_5$ Vol. 1 n Salzsäure und dreimal mit Wasser gewaschen und durch ein trockenes Filter filtriert. 2. Natronlauge 8 n. 3. Natronlauge 1 n. 4. Bromthymolblau 50 mg %ig, 1 g wird in einer Lösung von 13,62 g KH_2PO_4 in 60 cm³ 1 n NaOH gelöst, auf 2000 cm³ Wasser aufgefüllt und vor Gebrauch mit dreimal je 400 cm³ Benzol gewaschen. 5. Phosphatpuffer p_H 9—10 m/2.

Arbeitsgang. 10 cm³ Lösung (Harn, Serum), die 50—500 γ I enthalten sollen, werden mit 2 cm³ (2) versetzt und in einem 25 cm³-Schliffzentrifugenglas zweimal mit je 12 cm³ (1) 5 min geschüttelt und die durch ein trockenes Faltenfilter filtrierte Benzolphase zweimal mit je 5 cm³ (5) gewaschen. Dabei werden im Harn eventuell vorhandene Verunreinigungen, die sonst einen gefärbten Leerwert geben würden, entfernt. Das gewaschene Benzol wird erneut filtriert, 12 cm³ davon mit 4 cm³ (4) zur Bildung des Farbkomplexes geschüttelt, und nach erneutem Abtrennen und Filtrieren werden 8 cm³ der Benzolphase mit 2 cm³ (3) geschüttelt. Dabei geht der Farbkomplex in die Wasserphase über. 1 cm³ dieser Wasserphase wird mit 5 cm³ Wasser verdünnt und in einer 5 mm-Cuvette gegen Filter OG 2 im Havemann-Colorimeter gemessen. — Als Vergleich dient eine Kurve, die mit 50, 100, 200, 400, 600 γ I (Base) in 10 cm³ gewonnen wurde.

Bei den Ausscheidungsversuchen ergab sich die Notwendigkeit festzustellen, ob unter Abspaltung der Seitenkette Theophyllin entsteht. Bekanntlich gibt Theophyllin nach Aufkochen mit starkem Alkali unter Ringsprengung Theophyllidin, das mit verschiedenen Diazoniumverbindungen Farbstoffe bildet. Diese Qualität, als Kuppler zu dienen, fehlt jedoch dem I. Auch bei stärkerer Alkalianwendung bleibt die Substitution in 7-Stellung erhalten und es findet keine Ringsprengung statt. Die von Truitt beschriebene Methode der Theophyllinbestimmung, bei der das durch Aufkochen mit starkem Alkali erhaltene Theophyllidin mit „Fast Blue 2B Salt" (Zinkchloridsalz des diazotierten 5-Amino-2-benzoyl-amino-1,4-diäthyloxybenzol) eine Azoverbindung gibt, haben wir dahin geändert, daß wir Dianisidin benutzen.

Reagentien. 1. 50%ige Kalilauge, 2. Eisessig, 3. Dianisidin Reagens: 25 mg Dianisidin — Dichlorhydrat, aus Äthanol umkrist. werden in 3 cm³ Wasser gelöst, mit 0,3 cm³ konz. HCl und 0,6 cm³ Natriumnitrit (7%ig) und nach 5 min mit 1 cm³ Aminosulfosaures Ammonium versetzt. (Das Reagens muß für jeden Gebrauch unter Eiskühlung frisch hergestellt werden.) 4. Toluol z. A.

Arbeitsgang. 50—400 γ Theophyllin werden mit 1 cm³ (1) kurz aufgekocht, in Eiswasser abgekühlt, mit 2 cm³ Wasser verdünnt und anschließend, ebenfalls unter Eiskühlung, mit 0,2 cm³ (3) und 1,0 cm³ (2) versetzt, wobei beim Dianisidinzusatz zunächst eine gelbe Farbe auftritt, die bei Zugabe von Eisessig nach rot umschlägt. Anschließend wird der Farbstoff sofort unter Zusatz von weiteren 0,5 cm³ (2) und

einer Spatelspitze Kochsalz mit 15 cm³ (4) extrahiert. Die Toluolphase wird abgetrennt, durch trockenes Faltenfilter filtriert, wobei man eine blanke, rosa/violette Lösung einer bei Zimmertemperatur beständigen Farbe erhält. Der wäßrige Rückstand ist orange gefärbt. — Man colorimetriert die Toluolphase in einer 10 mm-Cuvette gegen Filter VG 9.

Theophyllin läßt sich noch in Mengen von 50 γ neben 1 mg I im Harn bestimmen.

2. Pharmakologische Eigenschaften

Resorption. I wird bei der Maus und Ratte intraperitoneal gut, subcutan und peroral langsam resorbiert. Beim Meerschweinchen erfolgt die Resorption s.c. und peroral rascher.

Verteilung. An 3 nierenlosen Hunden (Langecker) wurde nach der Verabreichung von 150 mg/kg I i.v. ein Verteilungsvolumen von 80% des Körpergewichtes ermittelt. Da dieser Wert den Wasserraum des Hundes, der von Levine mit 75% bestimmt wurde, sogar überschreitet, könnte man daran denken, daß die Substanz im Stoffwechsel verändert oder aber in Körperzellen stärker konzentriert wird als in der Extracellularflüssigkeit. Das Verhältnis der Liquor-, Kammerwasser- und Pericardkonzentration zu der im Blut ermittelten betrug nach Erreichen des Verteilungsgleichgewichtes 0,56, 0,5 bzw. 0,9. I dringt demnach gut in die Körperzellen ein und findet auch an den Schrankenmembranen des Subarachnoidalraumes und der Augenvorderkammer kaum einen Widerstand. Daher sind Unterschiede in der zentralen Wirkung von I und anderen Theophyllinen (siehe später) nicht auf ein geringeres Eindringungsvermögen von I zu beziehen.

Ausscheidung. Bei 4 Versuchspersonen wurde nach peroraler Verabreichung von 500—1000 mg I die Ausscheidung über 48 Std verfolgt. Es konnten 35—40% I wiedergefunden werden. Freies Theophyllin war nie nachweisbar (siehe Tab. 1).

Tabelle 1. *Ausscheidung von 7-(β-Isopropylamino-propyl)-theophyllin-Chlorhydrat im Harn beim Menschen nach peroraler Anwendung*

Versuchs-Nr.	Verabr. Menge mg	Gesamtausscheidung in Prozenten der Eingabe nach Std						
		½	1	2	4	7	24	48
1	500	6,5		16,7		26,7	37,7	
2	700	3,2	6,5	15,5		21,7	48,5	
3	1000	2,7	7,0	14,3	21,0	27,0	40,0	44,0
4	1000	1,6	2,5	6,5	10,0	16,5	35,0	

Über Veränderungen im Stoffwechsel im Sinne von Entmethylierung oder Oxydation geben die Versuche keine Auskunft.

Nach Brodie wird Theophyllin nach peroraler Gabe (750 mg) beim Menschen nur zu einem geringen Teil unverändert ausgeschieden (etwa 10%), etwa 50% liegen als 1-Methyl- bzw. 1,3-Dimethylharnsäure vor (vergleiche auch Weinfeld).

Allgemeine Verträglichkeit

Akute Verträglichkeit. Zum Vergleich wurden herangezogen: Theophyllinum Natrium aceticum (II), Theophyllin Äthylendiamin (III), 7-(β-Oxyäthyl)-theophyllin (IV), 7-Dihydroxypropyl-Theophyllin (V) und 1-(β-Oxypropyl)-theobromin (VI).

Maus, Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen siehe Tab. 2.

Tabelle 2. LD_{50} *mg/kg* (Kärber)

Tierart	Applikation	I	II	III	IV	V	VI
Maus	i.v.	361	257	249	344	1350[2]	
					505[2]		
	i. p.	305		257[3]	599[3]	1770[3]	780[4]
	s. c.	693	318[1]	238[1]	452[1]	1480[1]	
					420[2]	1450[2]	
	p. os	973		391[3]	855[3]	1954[3]	
Ratte	i.v.	347	311	288	486	860	
	i. p.	573					
	s. c.	879	188	176	438	1253	
	p. os	4200	583	522	2712		
Meerschweinchen	s. c.	376	180	222			
			322[1]				
	p. os	428	205	222			
Kaninchen	i.v.	215					

[1] = Koch, [2] = Jakobi, Lange u. Pfleger, [3] = McColl, Parker u. Ferguson, [4] = Giertz, Oberdorff u. Rummel.

Hund. Intravenös. 90 mg/kg in 3 min injiziert, wurden gut vertragen. Nach 180 mg/kg zeigten die Tiere verschiedene Grade von Erregung bis zu tonisch-klonischen Krämpfen. Eins von vier Tieren starb. — 40 mg/kg II und 30 mg/kg III riefen langanhaltende starke Erregung und Pulsbeschleunigung hervor, nach 180 mg kg traten tonisch-klonische Krämpfe auf, vier von vier Tieren starben.

Mensch — intravenös. 90, 180 und 350 mg (bis 3,5 cm³ einer 10%igen Lösung, in 3 min injiziert) wurden ohne Störung vertragen. Der systolische Druck (120 mm Hg) sank um 5—10 mm Hg, der diastolische (85 mm Hg) blieb unverändert oder stieg um 5 mm Hg. Die Pulsfrequenz war um 10% für 2 Std verlangsamt. Erst nach 500 mg trat sofort nach der Injektion leichtes Schwindelgefühl auf, der Blutdruck sank schnell vorübergehend um 25 mm Hg.

Chronische Verträglichkeit. *Ratte.* 11 Ratten im Gewicht von 95 bis 115 g erhielten 14 Tage hindurch 1 g/kg als 50%ige Suspension peroral. Die Gewichtszunahme betrug im Durchschnitt 25%. Das Blutbild zeigte keine Veränderungen. Im Harn fehlten pathologische

Bestandteile. Der histologische Befund der Leber und der Nieren war normal.

Hund. 4 Hunde erhielten 6 Monate lang täglich 6, 12, 24 u. 48 mg/kg I peroral. Das entspricht etwa einer 2-, 4-, 8- bzw. 16-fachen therapeutischen Dosis. Die 14tägig durchgeführten Blutbild- und Harnuntersuchungen zeigten keine pathologischen Veränderungen. Der histologische Befund von Leber, Niere, Milz, Herzmuskel und Pankreas war bei allen Tieren normal.

Lokale Verträglichkeit. 0,5 cm^3 von einer 20%igen Lösung bei Hund und Kaninchen bzw. 0,1 cm^3 bei der Ratte werden nach i.m. Injektion ohne Schmerzäußerung und lokale Reaktion vertragen. Intracutane Injektion von 0,1 cm^3 verursacht am Kaninchenohr Rötung. Injektion in die Bauchhaut des Meerschweinchens wurde ohne Reaktion vertragen. Ein Tropfen in das Kaninchenauge verursachte nur konjunktivale Injektion für einige Stunden.

An Kaninchenerythrocyten bewirkt eine 20%ige Lösung erst nach 24 Std Hämolyse.

Erregung. Die Prüfung der motorischen Erregung im Zitterkäfig an der Ratte ergab, daß I erst in sehr viel größeren Dosen erregt als die Vergleichspräparate. In Tab. 3 sind die Dosen zusammengestellt, bei denen 50% der Tiere Erregung zeigen.

Tabelle 3. ED_{50} *mg/kg i.v.*

I	V	IV	III	II
224,0	71,0	21,0	1,5	1,0

Analgesie. Die Schmerzreaktionszeit, gemessen an dem Pfotenlecken der Maus (Kupferplatte 58°), wird nach 90 mg/kg I um 50%, nach 90 mg/kg II um 80% und nach 60 mg/kg IV intraperitoneal um 75% verlängert.

Blutdruck. Katzen in Chloralose-Urethan, Kaninchen in Urethan-Narkose. — Die Blutdrucksenkung nach 1—16 mg/kg von I betrug 7 bis 44 mm Hg, von II 28—30, von III 7—38 mm Hg, IV zeigte keine konstante Blutdrucksenkung in diesem Dosenbereich. Durch Verlängerung der Injektionszeit von 10 auf 60 sec konnte nur die I-Senkung, nicht aber die der Vergleichspräparate, um 50% reduziert werden. Die Atmung wird von 2 mg/kg an frequenter und vertieft.

Isoliertes Kaninchenohr. (Mit l-Noradrenalinhaltiger Tyrode durchströmt.) Im Dosenbereich von 10^{-5} bis 10^{-4} kam es durch I zu Gefäßerweiterung um 26—60%, durch II um 23—50% und durch IV um 14%. III rief nach primärer Dilatation Konstriktion um 40% hervor.

Isoliertes Froschherz nach STRAUB. — Im Dosenbereich von $5 \cdot 10^{-5}$ bis $5 \cdot 10^{-4}$ verursacht I negative Ino- und Chronotropie, II, III und IV positive Ino- und Chronotropie und V und VI nur positive Inotropie (siehe auch LANGENDORFF-HERZ).

Leistungsmesser am Froschherzen nach JUNKMANN. — I und IV in der Konzentration 10^{-3} verursachen Verringerung des Schlag-Volumens, II und III Abnahme des Schlag-Volumens nach primärer Zunahme und V nur leichte Vermehrung. Die Herzfrequenz ist nach I und IV verlangsamt, nach II und III zuerst beschleunigt, sekundär verlangsamt und nach V nicht verändert.

LANGENDORFF-HERZ. Meerschweinchen 400—500 g. Nährlösung nach UHLMANN u. NOBILE. Die in den Schlauch injizierte Menge betrug 0,1 bis 0,2 cm^3.

Tabelle 4. *Vermehrung des coronaren Durchströmungsvolumens in Prozent der Ausgangsmenge*

Dosis	I	II	III	IV	V	VI
200 γ	37 (28)	18 (7)	12 (5)	4 (5)	0 (5)	7 (5)
500 γ	52 (48)	36 (7)	21 (5)	32 (12)	0 (5)	5 (5)
1 mg	91 (26)	65 (6)	41 (5)	48 (9)	0 (5)	21 (5)
2 mg	106 (14)	77 (5)	58 (5)	80 (5)	0 (5)	43 (5)
5 mg	132 (6)		65 (5)	115 (5)	15 (5)	66 (5)
10 mg			76 (5)		21 (5)	68 (5)
20 mg					35 (5)	
50 mg					53 (5)	

Zahl der Versuche in Klammern.

Betrachtet man die der therapeutischen Anwendung entsprechende Grenzdosis von 200 γ, so ist I doppelt so wirksam wie II, dreimal wirksamer als III, 9- bzw. 5mal stärker wirksam als IV bzw. VI. V ist ganz besonders wenig wirksam (siehe auch JAKOBI).

In dem untersuchten Dosenbereich wird durch I die Inotropie nicht verändert, höhere Dosen bewirken Bradykardie. II und IV verursachten positive Ino- und Chronotropie.

Herz-Lungen-Präparat nach STERN u. BEGOVIČ an der Ratte. Narkose nach LÜLLMANN. — 1 mg I war ohne Wirkung. 2, 4 und 8 mg riefen negative Chronotropie und Abnahme des Schlagvolumens hervor. 2 und 4 mg II bewirkte positive Chronotropie. Nach 2 mg Abnahme, nach 4 mg Zunahme des Minutenvolumens. (Hierzu siehe auch LÜLLMANN u. v. HAXTHAUSEN.)

Nach GOLLWITZER-MEIER ist „die Zunahme der Herzfrequenz der einzige Vorgang, der im Kreislaufantrieb die Güte der Kranzgefäßdurchblutung verschlechtert". — Auf Grund internistischer Erfahrungen

verlangt Schimert von einem idealen Präparat nicht nur Erweiterung der Coronargefäße, sondern gleichzeitig Verminderung der Herzleistung und des Minutenvolumens. I erfüllt nach den oben angeführten Versuchsergebnissen diese Forderungen weitgehendst.

Coronarspasmus durch Vasopressin an der narkotisierten Ratte nach Roessler u. Antopol. — Der Vasopressin-Coronarspasmus äußert sich im EKG (II Ableitung) durch das hohe T (sogenanntes Erstickungs-T). Eine unbehandelte Kontrollgruppe von 20 Tieren zeigte im Durchschnitt nach 8 E/kg i.v. Vasopressin eine Vergrößerung der T-Zacke um 200%. Diese Erhöhung konnte durch 9 mg/kg i.v. I bei allen, durch 9 mg/kg IV nur bei zwei von fünf Ratten verhindert werden. II war bis 15, V bis 30 mg/kg ohne Wirkung.

Elektrokardiogramm. *Ratte* (in Evipan-Narkose) — I rief bis 350 mg/kg i.v. nur Bradykardie hervor, welche durch 0,3 mg/kg Atropin nicht beeinflußt werden konnte. II verursachte nach 10 mg/kg i.v. Erhöhung der T-Zacke von 0,2 auf 0,4 mV und starke Tachykardie.

Einfluß auf die Strophantin-Toxicität. Hildebrandt u. Dörner haben erneut die Frage der Veränderung der Strophantingiftigkeit durch

Tabelle 5. *Änderung der letalen Strophantindosis durch gleichzeitige Theophyllin-Infusion*

	LD_{100} g-Strophantin und								
		LD_{100}[1]				$LD_{1/6}$			
		I	III	IV	V	I	III	IV	V
Strophantin LD_{100} γ/kg	202 ± 6,4 (6)	202 ± 28,7 (8)	147 ± 3,3 (6)	187 ± 18,7 (6)	164 ± 4,9 (6)	445 ± 22,5 (7)	242 ± 17,9 (6)	294 ± 24,6 (7)	273 ± 14,2 (6)

In Klammern: Zahl der Versuche.
[1] per infusionem ermittelt.

coronarerweiternde Pharmaka untersucht und stellten bei Dauerinfusion nach Hatcher unter gleichzeitiger Verabreichung coronarerweiternder Stoffe eine Beziehung zwischen Durchblutung und letaler Strophantindosis fest. Beim Meerschweinchen fanden sie, daß die Dosis letalis des g-Strophantin von 389 γ/kg bei gleichzeitiger Verabreichung von etwa der LD/6 von IV auf 223 γ herabgesetzt wird. Wir prüften diese Frage an Meerschweinchen im Gewicht von 320—420 g in Urethan-Narkose. Die Infusionsgeschwindigkeit betrug, wie nach Dörner, 14 cm^3/Std. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengestellt.

Nach diesen Ergebnissen verändert die gemeinsame Infusion der letalen g-Strophantinmenge mit der letalen Dosis I bzw. IV die

Strophantindosis nicht. Durch die letale Dosis von V und III wird sie um 20 bzw. 30% herabgesetzt. Die gemeinsame Infusion der letalen Strophantindosis mit dem Sechstel der letalen Theophyllindosis führt sogar zu einer Minderung der Strophantintoxicität, besonders durch I.

Glatte Muskulatur. Darm. *Isolierter Meerschweinchen-Dünndarm.* I hat keine Eigenwirkung auf den Darm. Der $BaCl_2$-Spasmus wird durch 10^{-6} I, die Acetylcholin- und Histamin-Kontraktion durch 10^{-5} gehemmt. Am isolierten *Kaninchen-Dünndarm* verursacht I und II durch 10^{-6} bzw. 10^{-5} Tonuserhöhung. Der Acetylcholin-Spasmus wird nicht beeinflußt.

Uterus. Kaninchen. I verursacht nach 10^{-3} Kontraktionen und verstärkt durch 10^{-4} die Adrenalinwirkung. Nach 10^{-5} II wird die Adrenalin-Kontraktion verstärkt, durch 10^{-4} unterdrückt. Die I-Kontraktionen können durch Sympathicolytica nicht beeinflußt werden.

Tabelle 6. *Kontrakturwirkung auf den isolierten Musc. gastrocnemius des Frosches* (Die Zahlen bedeuten Prozent der maximalen Kontraktion bei elektrischer Reizung)

Injektion Menge	Theophyllin. purum	II	I	IV	V
45 γ	0				
62,5 γ	6	4			
90 γ	54	6		0	
125 γ	67	29		3	
180 γ	78	67		32	
250 γ	91	82		57	
360 γ	93	84		80	
500 γ		87		91	
720 γ		97		98	
1 mg		100	8	100	
2 mg			17		75
5 mg			38		83
10 mg			56		92

Bronchialmuskulatur. Gegen das Acetylcholin-Asthma der Meerschweinchen (es werden 10 cm³ einer 1,2%igen Lösung in einem 10 l-Gefäß in 2 min versprüht) sind 125 mg/kg I, 180 IV, 250 VI, 360 V, 60 II und 90 mg/kg III nach subcutaner Vorbehandlung (30 min) wirksam. Die Grenzdosen beim Histamin-Spasmus (10 cm³ einer 0,185%igen Lösung) sind für II 45 mg/kg, III 90, IV 90, VI 180, V 250 und I größer als 180 mg/kg.

Kontrakturwirkung auf den Musc. Gastrocnemius des Frosches. Straub u. Dordoni haben die Kontrakturwirkung der Purine am Skeletmuskel des Frosches als biologische Nachweismethode empfohlen.

In der gleichen Versuchsanordnung haben I und V die Fähigkeit zur Kontrakturerzeugung weitgehendst verloren. Durch die Substitution in 7-Stellung ist ein Stoff entstanden, der noch viele, aber nicht alle Eigenschaften des Theophyllins besitzt (vgl. Tab. 6).

Diurese. *Ratten* (weibl.). Am Vorabend und Versuchstag Wasserbelastung mit 3 cm³/100 g peroral. Harnentnahme durch Katheter. (Eine cyclusbedingte Änderung der Ausscheidung konnte durch Vorversuche

Tabelle 7. *Harnausscheidung in Prozent gegenüber den Kontrolltieren*

Dosis mg/kg i.v.	Substanz	Zeit in Std nach der Injektion		
		1	2	3
40	I	+ 300	+ 120	— 45
	II	— 75	— 60	— 45
	IV	— 25	— 70	— 67
80	I	+ 320	+ 140	+ 133
	II	— 50	— 70	— 55
	IV	+ 150	+ 120	— 33

ausgeschlossen werden.) — An einer Gruppe von 10 unbehandelten Tieren wurde die Harnausscheidung verfolgt. Die Durchschnittswerte, nach 1, 2 und 3 Std mit 0,4, 1,0 bzw. 0,9 cm³, wurden gleich 100% gesetzt (Tab. 7).

Nach 40—80 mg/kg i.v. waren II und IV mehrfach sogar antidiuretisch wirksam. I verursachte dagegen deutliche Zunahme der Harnmenge.

Tabelle 8. *Vermehrung der Harnausscheidung in Prozent gegenüber der Vorperiode*

Dosis mg/kg i.v.	Substanzen	Zeit in Std nach der Injektion			
		1	2	3	4
5	I (4)	275	600	175	
	II (4)	200	175	150	
	IV (4)	110	110	120	
10	I (8)	1200	1450	1075	900
	II (8)	1100	350	500	550
	IV (5)	550	575	520	540
	V (4)	150	100	175	175

In Klammern Zahl der Versuche.

Kaninchen. Am Vortag Wasserbelastung mit 50 cm³/kg peroral. Während des ganzen Versuches i.v. Dauerinfusion von 0,50 cm³/min physiol. Kochsalzlösung. Nach einer Vorperiode von 2 Std, deren Harnmenge gleich 100% gesetzt wird, wurden die Substanzen i.v. verabreicht (Tab. 8).

Nach 5 und 10 mg/kg kommt es zu einer Steigerung der Diurese. I ist den Vergleichssubstanzen deutlich überlegen.

Mensch. 2 Versuchspersonen erhielten am Vorabend und Versuchstag eine Wasserbelastung von 500 (Versuchsperson A) bzw. 1000 cm³

Tabelle 9. *Harnausscheidung beim Menschen nach I*

Versuchsperson	Dosis mg	Applikation	Zeit in Std 1 cm³	2 cm³	3 cm³	4 cm³	Gesamtmenge in cm³
A	Kontrollversuch		50	63	50	50	213
	90	i.v.	290	200	85	50	625
	550	i.v.	400	250	60	50	760
	1000	p. os	225	225	100	60	610
B	Kontrollversuch		250	525	150	75	1000
	90	i. v.	600	350	100	150	1200

(Versuchsperson B). In einem bzw. zwei Vorversuchen wurde die Harnausscheidung über 4 Std verfolgt (Tab. 9).

Nach 90 und 550 mg i.v. und 1 g peroral wirkt I stark diuretisch. Gleichzeitig kommt es zu Vermehrung der Chloridausscheidung.

Zusammenfassung

Es werden einige chemische und pharmakologische Eigenschaften von 7-(β-Isopropylamino-propyl)-theophyllin-hydrochlorid beschrieben. Die Verbindung ist leicht wasserlöslich, gut verträglich, sie zeigt die therapeutisch erwünschten Theophyllinwirkungen, z. B. Coronardilatation und Diurese in besonderem Maße. Sie unterscheidet sich vom Theophyllin durch das Fehlen sowohl der zentralen Erregung als auch der Pulsfrequenzbeschleunigung und inotropen Wirkung. Die Kontrakturwirkung am quergestreiften Muskel ist stark abgeschwächt. Hinsichtlich der antiasthmatischen Wirkung gestattet die Untersuchung noch keine endgültige Beurteilung.

Fräulein Marie-Luise Eipel und Fräulein Renate Lendorff haben bei der Durchführung der Arbeit wertvolle Hilfe geleistet.

Literatur

Antopol, W., u. R. Rössler: Z. exper. Med. **94**, 453 (1934). — Brodie, B. B., J. Axelrod and J. Reichenthal: J. of Biol. Chem. **194**, 215 (1952). —McColl, J. D., J. M. Parker and J. K. W. Ferguson: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **116**, No. 3, 343 (1956). — Dörner, J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 152 (1955). — Giertz, H., A. Oberdorf und W. Rummel: Arzneimittel-Forsch. **6/8**, 457 (1956). Gollwitzer-Meier, Kl., u. Ch. Kroetz: Klin. Wschr. **1940**, 616. –

Haxthausen, E. v.: Arzneimittel-Forsch. **5**, 370 (1955). — Hildebrandt, F.: Dtsch. med. Wschr. **1956**, 226. — Jakobi, H., A. Lange und K. Pfleger: Arzneimittel-Forsch. **6**, 41 (1956). — Junkmann, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **96**, 63 (1922). — Koch, R.: Arzneimittel-Forsch. **4**, 649 (1954). — Langecker, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 278 (1953); **226**, 417 (1955). — Levine, R., M. Goldstein, S. Klein and B. Mudlestum: J. of Biol. Chem. **179**, 985 (1949). — Lüllmann, H.: Arch. Kreislaufforsch. **23**, 11 (1955). — Schimert, G.: Schweiz. med. Wschr. **1951** II, 643. — Straub, W., u. F. Dordoni: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 129 (1942). — Truitt, E. B.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **91**, 185 (1947). — Uhlmann, Fr., u. Fr. Nobile: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **192**, 189 (1939). — Weinfeld, H., and A. A. Christmann: J. of Biol. Chem. **200**, 345 (1953).

Prof. Dr. Hedwig Langecker, Hauptlaboratorium der Schering A.G., Berlin N 65, Müllerstr. 170/172

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 205—207 (1957)

Aus der Anstalt für anorganische Chemie der Universität Basel

Zur quantitativen Bewertung von Metallkomplexbildnern*

Von
S. Fallab und H. Erlenmeyer

(Eingegangen am 20. November 1956)

Schon wiederholt ist die Fähigkeit gewisser organischer Strukturen, Schwermetallionen koordinativ zu binden, mit der biologischen Wirkung solcher Verbindungen in Beziehung gebracht worden[1–5, 8–11, 13]. Man ging dabei von der Vorstellung aus, daß der Wirkungsmechanismus auf der Hemmung eines Metallenzyms beruht und daß entsprechend der Stabilität der Chelate MeX^{2+} das Enzym stärker oder schwächer gehemmt wird[1].

$$\underbrace{\text{Protein-Me}^{2+} + X \rightleftharpoons \text{Protein} + \text{Me}\,X^{2+}}_{= \text{Aktives Enzym.}} \qquad (1)$$

Als geeignete Inhibitoren haben sich insbesondere starke Komplexbildner wie α,α'-Dipyridyl, o-Phenanthrolin, 8-Hydroxychinolin, Äthylendiamintetraessigsäure, Hydroxylamin und KCN erwiesen[6, 12, 14]. Man hat bei solchen vergleichenden Untersuchungen deshalb die biologische Wirkung direkt mit der Komplexstabilitätskonstanten $\mathfrak{K}$ (2) in Zusammenhang gebracht[1, 4, 8, 13].

$$\mathfrak{K} = \frac{[MeX^{2+}]}{[Me^{2+}]\,[X]} \,. \qquad (2)$$

Dieser Vergleich läßt aber im Falle von schwachen Säuren und Pseudosäuren RH wie z. B. 8-Hydroxychinolin und Carbonsäurehydraziden, die mit Schwermetallionen unter Abspaltung eines H^+ reagieren (3)

$$RH + Me^{2+} \rightleftharpoons MeR^{+} + H^{+} \qquad (3)$$

unberücksichtigt, daß je nach dem p_H, bei dem die biologischen Teste durchgeführt werden, die in die Massenwirkungsgleichung (4) eingehende Konzentration (R^-) sehr klein sein kann.

$$\mathfrak{K} = \frac{[MeR^{+}]}{[Me^{2+}]\,[R^{-}]} \,. \qquad (4)$$

Es ist deshalb in solchen Fällen richtig, die zur Reaktion (3) gehörende Massenwirkungsgleichung (5) zu betrachten und für den Vergleich mit Resultaten biologischer Versuche die konstante $\mathfrak{K}^*$ heranzuziehen[5].

* Herrn Prof. Dr. R. Meier zu seinem 60. Geburtstag gewidmet.

$$\mathfrak{K}^* = \frac{[MeR^+] \cdot [H^+]}{[Me^{2+}] \cdot [RH]} \quad (5)$$

Um nun einen gemeinsamen Vergleich der Wirkung von Verbindungen vom ersten Typus (z. B. Dipyridyl, das beim $p_H = 7$ praktisch vollständig als freie Base vorliegt) wie vom zweiten Typus RH (z. B. INH, Isonicotinsäurehydrazid, das beim $p_H = 7$ vollständig undissoziiert vorliegt) durchführen zu können, ist es wünschenswert, eine einheitliche Maßzahl zu haben, die für alle Verbindungen sinnvoll mit biologischen Resultaten in Beziehung gesetzt, und mit der insbesondere ein Komplexbildner in seiner Wirkung als Inhibitor eines Metallenzyms quantitativ gekennzeichnet werden kann.

Es muß zur Definition dieser Maßzahl x ein Ausdruck verwendet werden, der an Stelle der Konzentration $[R^-]$ (4) bzw. $[RH]$ (5) die Gesamtkonzentration c_o an Komplexbildner, wie sie im biologischen Test figuriert, enthält (6).

$$x = \frac{[MeR^+]}{[Me^{2+}] \cdot c_o} \quad (6)$$

$$c_o = [RH] + [R^-] \quad (7)$$

$$K_s = \frac{[R^-] \cdot [H^+]}{[RH]} \quad . \quad (8)$$

Unter Berücksichtigung der Gleichungen (4) (6) (7) und (8) erhält man dann eine einfache Beziehung zwischen der konventionellen Komplexstabilitätskonstanten $\mathfrak{K}$ und x (9), in der der Umrechnungsfaktor f gegeben ist durch (10).

$$xf = \mathfrak{K} \quad (9)$$

$$f = 1 + 10^{pK_s - p_H} \quad . \quad (10)$$

In diesem Ausdruck für den Umrechnungsfaktor f bedeutet K_s die Aciditätkonstante des Komplexbildners RH, und p_H bezieht sich auf das Milieu, bei dem der in Betracht fallende biologische Test durchgeführt wird. Für $p_H \gg pK_s$ ist unsere Maßzahl x identisch mit der Komplexstabilitätskonstanten $\mathfrak{K}$ und für $p_H \ggg pK_s$ — also für sehr schwache Säuren — wird

$$x = \mathfrak{K}^* \cdot 10^{-p_H} \quad .$$

Die nachfolgende Tabelle mag diese Ausführungen illustrieren. Sie enthält log x-Werte, die für ein Vergleichs-p_H 7 berechnet wurden, und es zeigt sich nun, daß log x dem Vermögen, unter bestimmten Standardbedingungen Metallionen zu binden (wiedergegeben durch Prozent gebundenes Metallion), parallel geht, und daß die konventionelle Stabilitätskonstante für dieses Bindungsvermögen ein falsches Bild vermittelt. Insbesondere fällt auf, daß Penicillin mit einer relativ kleinen Stabilitätskonstanten dennoch ein sehr starkes Bindungsvermögen für Cu^{2+} besitzt[15].

Tabelle 1

	$\frac{Me^{2+}\text{ geb.}}{Me^{2+}\text{ frei}}$	% Me geb.	log β	log x
Äthylendiamintetra-essigsäure	10^9	100	18,3[7]	15
Oxin	$1{,}6 \cdot 10^3$	100	15[7]	12,2
α, α'-Dipyridyl . . .	1	50	6[7]	6
α-Picolinsäure . . .	0,4	29	5,6[15]	5,6
Glykokoll	0,2	17	8,1[15]	5,3
Penicillin	0,063	6	4,8[15]	4,8
INH	0,016	1,6	8[5]	4,2

Die in der Tabelle wiedergegebenen Werte für das Cu^{2+}-Bindungsvermögen beziehen sich auf ein Standardsystem, in dem die Gesamtkonzentration an Komplexbildner 10^{-6} beträgt und gegenüber den Cu^{2+} im Überschuß vorhanden ist. Die Werte wurden berechnet unter der Annahme, daß sich nur der 1:1-Komplex ausbildet, was wohl für die Verhältnisse im biologischen Milieu am ehesten zutreffend ist.

Summary

The possibilities of comparing stability constants of metal complexes with the results of biological inhibition reactions, produced by these chelating agents, are discussed.

Literatur

[1] Albert, A.: Nature **177**, 525 (1956). — [2] Albert, A., M. I. Gibson and S. D. Rubbo: Brit. J. Exper. Path. **34**, 119 (1953). — [3] Albert, A., A. Hampton, F. R. Selbie and R. Simon: Brit. J. Exper. Path. **35**, 75 (1954). — [4] Clark, W. G.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **95**, 363 (1949). — [5] Fallab, S.: Helvet. chim. Acta. **37**, 645 (1954): Experientia **10**, 190 (1954). — [6] Feeney, R. E., and D. A. Nagy: J. Bacter. **64**, 629 (1952). — [7] Martell, A. E., and M. Calvin: Chemistry of the metal chelate compounds. New York 1952. — [8] Rees, C. W.: „Why are some metal binding substances antibacterial?" International conference on coordination chemistry 1955. — [9] Rubbo, S. D., A. Albert and M. I. Gibson: Brit. J. Exper. Path. **31**, 425 (1950). — [10] Schuler, W., u. R. Meier: Schweiz. Z. allg. Path. **8**, 464 (1950). — [11] Schuler, W., u. R. Meier: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 169 (1954). — [12] Shimura, K., H. Nagayama and A. Kikuchi: Nature **177**, 935 (1956). — [13] Vajda, M., and T. Nogradi: Experentia (Basel) **10**, 373 (1954). — [14] Vallee, B. L., and H. Neurath: J. of Biol. Chem. **217**, 253 (1955). — [15] Weiss, A.: Diss. Basel 1956.

Prof. Dr. H. Erlenmeyer, Basel/Schweiz, Spitalstr. 51

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 208—222 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Professor Dr. L. Lendle)

Toxicität und Elimination von esteraseblockenden Alkylphosphaten und Eserin bei Dauerinfusionen*

Von
W.-D. Erdmann und L. Lendle

(Eingegangen am 30. November 1956)

Vergiftungen mit Alkylphosphaten zeigen im Tierversuch ein sehr komplexes Geschehen mit Erregungs- und Lähmungserscheinungen im Bereich des vegetativen Nervensystems, insbesondere des parasympathischen, und des zentralen Nervensystems in allen Teilen. Es ist oft sehr schwer zu entscheiden, ob eine Atemlähmung, ob eine zentrale oder periphere Vasomotorenlähmung bzw. Herzversagen die letzte Todesursache ist. Demgegenüber versucht man die Vergiftungen mit dieser Stoffgruppe einheitlich aus einer Blockade der Acetylcholinesterase zu erklären. Es wird auch vermutet, daß im Zentralnervensystem, wo überall Esterase nachgewiesen wurde, eine Erregungsübertragung über Acetylcholin erfolgt, daß also auch Krampferregungen durch Alkylphosphate als Folge einer Esteraseblockierung erklärt werden könnten.

Der Vergiftungsablauf ist nicht nur bei Inhalation der Dämpfe von Stoffen der sogen. Tabungruppe sehr schnell, sondern auch bei der oralen oder intraperitonealen Verabreichung von Insekticiden aus der Phosphorsäureestergruppe, während diese schwer löslichen Stoffe bei der subcutanen Injektion unzuverlässig resorbiert werden. Eine langsame intravenöse Dauerinfusion dieser Gifte müßte den Ablauf der Vergiftung besser überblicken lassen und würde auch eindeutiger den Wert geeigneter Antidote beurteilen lassen. Die Bindung der Alkylphosphate an die Esterase verläuft übrigens mit einem bestimmten Zeitfaktor, der bei zu schneller Dosierung eine Übertitration bedingen könnte. Ferner weiß man, daß die Reaktivierung des blockierten Fermentes sehr langsam erfolgt. Zum Teil ist die Bindung an das Ferment irreversibel (bei DFP), so daß nur eine Neubildung des Fermentes die Wiederherstellung normaler Funktionen ermöglichen soll.

Die Geschwindigkeit der Eliminationsvorgänge für solche esteraseblockierende Stoffe könnte evtl. wie bei den Digitalisglykosiden als Maß ihrer Kumulationsneigung aus Unterschieden der Toxicität bei verschiedener Infusionsgeschwindigkeit bestimmt werden (Hauptstein).

* Herrn Professor Dr. R. Meier-Basel zum 60. Geburtstag gewidmet.

Über die Größe der Eliminationsfähigkeit kann man sich aus einigen quantitativen Angaben von Wirth (1949) Vorstellungen machen. Er injizierte wochenlang bei Mäusen täglich subletale Dosen von Mintacol (E 600, Paraoxon) und fand mit 0,2 mg/kg keine kumulative Vergiftung, während 2 Einzelinjektionen von 0,3 mg/kg (halb let. Dosis), im Abstand von 6 Std verabreicht, Vergiftungserscheinungen ohne tödlichen Ausgang auslösten. Wirth berechnet aus einem weiteren Versuch, daß in 2 Std etwa 0,1 mg/kg eliminiert werden können. Auch für einen anderen Phosphorsäureester („Systox") fand Wirth (1953) keine sehr hohe Kumulation. 30 Tage lang wurde ein Achtel der tödlichen Dosis täglich injiziert. Danach hatte die Cholinesteraseaktivität im Blut wesentlich abgenommen (40%), ohne daß aber schwere Vergiftungserscheinungen eintraten.

Kewitz, Wilson u. Nachmansohn ermittelten bei Mäusen, denen Paraoxon (E 600) oder DFP in höherer Dosis verabreicht worden war, nämlich die LD 50 oder (unter Atropinschutz u. a.) auch eine vielfache Dosis, daß in Zwerchfell und Hirn der Versuchstiere die Esteraseaktivität sehr langsam wiederkehrte. Ferner fanden sie bei täglichen subcutanen Injektionen von etwa 70% der LD 50 nach 6 Injektionen bei den diese Dosen überlebenden Tieren eine Esteraseaktivität im Hirn von 10% und im Zwerchfell von 2% der Norm.

Koelle u. Gilman (1946, 1949) hatten bei Hunden zweimal wöchentlich 0,05—0,3 mg/kg DFP intramuskulär injiziert. Dabei hatten sie trotz starken Verlustes an Esteraseaktivität nur sporadisch nikotinartige Vergiftungserscheinungen beobachtet. Sie nehmen danach an, daß die Cholinesterase für den Erregungsablauf nicht unentbehrlich sei und daß bei chronischen Vergiftungen eine Wiederbeseitigung des Acetylcholins auch in anderer Weise zustande kommt. Erst bei 12 Wochen langer Behandlung mit 0,3—0,5 mg/kg DFP (zweimal wöchentlich) traten muscarinartige, zum Teil tödliche Vergiftungen ein.

Diese verschiedenen Feststellungen lassen die Vermutung aufkommen, die auch von Heymans u. a. geäußert wurde, daß vielleicht die Toxicität der Phosphorsäureester und anderer Esteraseblocker nicht allein auf dieser Fermentausschaltung beruhe. Bei unseren Versuchen mit langsamer Infusion während begrenzter Zeiten konnte aber unabhängig von diesen theoretischen Erwägungen die Frage einer Kumulationsneigung der Giftwirkung infolge geringer Eliminationsfähigkeit in den ersten Stunden, wo vielleicht die akute Esteraseausschaltung eine wesentlichere Rolle spielt, beurteilt werden.

Übrigens sind neuestens auch Eliminationsprüfungen mit radioaktiven Phosphorsäureester-Präparaten (P^{32}) ausgeführt worden. Wirth[1] berichtet über Versuche mit einem Systox-Isomeren, daß am Kaninchen in 24 Std neun Zehntel des P^{32} in nichttoxischer Form in der Niere ausgeschieden wird.

Im Säugetierorganismus scheint das nichtspezifisch verankerte Gift durch Fermente in Blut und Organen doch relativ leicht abgebaut zu werden. Für das „Tabun" z. B. ist im Blut von Augustinsson und Heimbürger eine spezifische „Tabunase" nachgewiesen worden. Ebenso hat Hoskin für Sarin mit Rattenserum eine hydrolytische Fluorabspaltung gezeigt.

A. Methodik

Die Ermittlung des Eliminationswertes sollte nach Unterschieden der Toxicität bei verschiedener Infusionsgeschwindigkeit erfolgen. Da sich bald zeigte, daß in der maximal möglichen Infusionsdauer von 6—10 Std keine Unterschiede der letalen

[1] Briefliche Mitteilung.

Dosen gegenüber kürzeren Infusionszeiten auftraten, wurde noch ein zweiter Weg gewählt, der auch schon bei Ermittlung der Digitalis-Kumulationsneigung beschritten wurde. Es wurden 30—55% der tödlichen Dosis intraperitoneal beim Meerschweinchen injiziert und erst nach mehreren Tagen eine langsame intravenöse Nachtitration der tödlichen „Auffülldosis" durchgeführt. Aus der Differenz der gesamten verabreichten Menge und der sonst bei einzeitiger Infusion tödlichen Dosis ergab sich annähernd die Menge (in % der tödlichen Dosis), die in der Zwischenzeit eliminiert sein konnte. Natürlich ergeben sich gegen dieses Verfahren die gleichen Bedenken, die seinerzeit von Fromherz u. Bauer gegen das Verfahren von Hatcher erhoben worden waren, daß die Tiere geschädigt seien und somit die Titration der letalen Dosis zu niedrige Werte ergeben kann, ohne daß dabei nur die chemische Speicherung erfaßt würde.

Noch zwei weitere kritische Bedenken müssen wir selbst vortragen. Sie mögen für die Weiterführung der Fragestellung auch nicht ohne Bedeutung bleiben.

1. Bei der langsamen Infusion könnte die Verteilung der Gifte anders sein als bei der schnellen Resorption im Verlauf akuter Vergiftungen, nicht nur im Hinblick auf das zentrale Nervensystem und Herz als bevorzugt durchblutete Organgebiete. Es könnte auch sein, daß bei kurzfristigen Vergiftungen, ehe die spezifische Verankerung am Ferment abgeschlossen ist, eine unspezifische Bindung an andere chemische Substrate erfolgt. Wenn diese evtl. weniger fest ist, könnte eine Rückwanderung eintreten und ein Verteilungsgleichgewicht erst allmählich erwartet werden.

2. Wenn eines der verwendeten Gifte, wie E 605, im Organismus konvertiert wird, d. h. wenn der Thiophosphorsäureester Parathion sich in seinen Phosphorsäureester Paraoxon umlagert, dann könnte je nach der Infusionsgeschwindigkeit eine Verstärkung der Toxicität eintreten, weil das Paraoxon vielfach giftiger sein soll (Wirth, 1949). Andererseits soll das Parathion nach Enders auch unter Abspaltung des Nitrophenols vor der Verankerung des Moleküls am Ferment noch Sonderwirkungen äußern (Lähmungen von Herz und Zentralnervensystem), die dem gesamten Molekül auf Grund der Esteraseblockierung nicht zukämen. Auch dieses zeitbedingte Verhalten könnte, wenn die Hypothese stimmt, in unsere Versuchsergebnisse eingehen.

Es wurden folgende allgemeine Versuchsbedingungen gewählt: Meerschweinchen im Gewicht von 420—750 g wurden 1—2 Std vor Versuchsbeginn mit Urethan (1,1 g/kg) betäubt. In die V. jugularis wurde eine Hahnkanüle eingelegt. Die Trachea wurde freigelegt und eröffnet, ohne Einbindung einer Kanüle, um die während der Vergiftung gebildeten Schleimmassen leicht austupfen zu können. Die Infusion erfolgte mit früher beschriebenem Infusionsgerät (Hoffmann u. Witte). Die erforderlichen Konzentrationen der Stoffe[1] wurden je nach der beabsichtigten Dosierungsgeschwindigkeit (mg/kg/Std) gewählt. Als Volumina pro Std wurden etwa 10,0 cm³ infundiert. Während der Infusion wurden fortlaufend die Pulsfrequenz (auskultatorisch) und die Atemfrequenz mit Stoppuhr bestimmt.

In einigen Versuchen wurden verschiedene Antidote geprüft. Insbesondere wurde bei einigen Tieren die Toxicität unter künstlicher Beatmung ermittelt, um den Anteil der Atemlähmung an der Vergiftung auszuschalten. Über die besonderen methodischen Bedingungen vergleiche die Angaben in den folgenden Abschnitten.

[1] Die reinen Wirkstoffe E 605 (Parathion) und E 600 (Paraxon) wurden uns freundlicherweise von Professor Dr. med. et phil. W. Wirth, Elberfeld, überlassen.

B. Versuche mit E 605 (Parathion)

An 2 Versuchsbeispielen möge zunächst kurz der Versuchsablauf gezeigt werden.

Die Atmung wurde zuerst gelähmt. Die Versuchstiere zeigten in der Schlußphase bei wenigen Atemzügen pro min meist eine starke Cyanose. In diesem Zustand, der 30 oder mehr min anhalten konnte, wurde der Puls auch allmählich seltener und schwächer.

Gewicht g	Vers. Dauer min	Atmungs-frequenz	Puls-frequenz	Letale Dosis mg/kg
720	0	80	280	
	60	60	200	
	120	44	260	
	180	36	180	
	225	6	92	8,22 in 245 min
560	0	56	300	
	60	40	300	
	120	40	280	
	180	48	220	
	240	36	100	
	300	12	40	8,46 in 306 min

Da die Versuchstiere narkotisiert waren, traten keine Krämpfe auf, sondern nur fibrilläre Muskelzuckungen. Eine starke vagusbedingte Bradykardie vor der Atemdepression war selten zu erkennen. Bei der Sektion der verstorbenen Tiere zeigten die Lungen oft breitflächenhafte Blutungen (Erstickungsfolge), nie eine Blähung oder ein Ödem.

I. Titration der letalen Dosen

Alle Versuchsergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Sie lassen eine große Streuung erkennen. Die Anordnung der Versuche nach abnehmender Dosierungsgeschwindigkeit (Spalte 3) zeigt, daß bei zu schneller Titration (Nr. 7 u. 9) offensichtlich eine Überdosierung erfolgte, weil im Zeitpunkt des eingetretenen Todes noch keine volle Fixierung der infundierten Giftmenge an den spezifischen Angriffspunkten erfolgt ist. Man weiß auch aus Versuchen in vitro, daß die Bindung der Phosphorsäureester an die Esterase eine gewisse Zeit erfordert. Wenn man die mit * bezeichneten Versuche ausklammert (wegen zu schneller Titration bzw. wegen des noch nicht erreichten letalen Ausganges), so kann folgender Mittelwert der LD statistisch festgelegt werden:

$$8{,}6 \pm 1{,}6 \text{ mg/kg}.$$

Für die Eliminationsfähigkeit des Stoffes läßt sich aus den Versuchsergebnissen nichts Positives ableiten. Es trat mit Verlangsamung

der Dosierungsgeschwindigkeit keineswegs eine Erhöhung der tödlichen Dosis auf, wie dies für viele leichter eliminierbare Stoffe mit dem gleichen Verfahren gezeigt worden ist (Hauptstein, Lendle u. Mitarb.).

Tabelle 1. *E 605-Titration an Meerschweinchen i. v.*

Gewicht g	mg/kg/Std	Letale Dosierung	
		in min	mg/kg
650	36	25	14,9*
800	30	30	14,9*
700	18	36	10,7
750	16	35	9,4
700	14	40	9,3
600	13,2	37	8,2
600	13,2	44	9,7
600	13,0	48	10,4
670	12,5	45	9,4
700	12	43	8,5
700	5,6	120	11,2
810	5,0	97	8,1
850	4,66	90	7,0
500	4,5	> 300	> 9,0*
700	4,0	130	8,65
840	3,33	150	8,3
800	2,4	125	5,0
680	2,32	151	5,83
480	2,3	> 300	> 11,5*
720	2.0	245	8,22
560	1,66	306	8,46

II. Nachtitration bei vorbehandelten Meerschweinchen

Um eine längere Zeitspanne für Eliminationsvorgänge prüfen zu können, wurden Meerschweinchen 5 mg/kg = 55% der tödlichen Dosis intraperitoneal injiziert und im Abstand von 24 Std bis 7 Tagen eine Nachtitration der tödlichen Dosis (Auffülldosis) angeschlossen. Die Befunde sind in Tab. 2 zusammengestellt. Darin ist die letale Gesamtdosis (Vordosis + Auffülldosis) in der letzten Spalte angegeben. Es ergibt sich daraus, daß die Gesamtdosis nur in den Versuchen, wo die Nachtitration erst nach 2 Tagen erfolgt, mehr als 20% über der angenommenen tödlichen Dosis liegt. Nach 7 Tagen lag sie praktisch so hoch, daß die 50% Vordosis wohl als eliminiert gelten kann, denn es wurde die übliche Grenzdosis benötigt.

Auch diese Versuche lassen also nur eine *sehr geringe Elimination* erkennen, wenn man die letale Wirkung bei der Nachtitration wirklich als eine Summation der Esteraseblockung durch Vor- und Nachdosis betrachten darf. Es bestünde nämlich auch eine Möglichkeit der dynamisch-funktionellen Kumulation als Folge von bestehenden Nachschäden.

Tabelle 2. *E 605-Vorinjektion und Nachtitration*

Gewichte in g		Vorinjektion i. p.		letale Nachtitration		letale Gesamtdos. mg/kg
vorher	nachher	mg/kg	Zeit vorher	in min	mg/kg	
500	—	5,0	0	135	5,0	10,0
760	760	5,0	20 Std	165	3,83	8,83
720	720	5,0	23 „	> 240	> 4,2	> 9,2
—	490	5,0	48 „	150	6,37	11,37
—	350	5,0	51 „	153	6,34	11,34
700	670	5,0	3 Tg.	170	7,16	12,16
440	410	5,0	3 „	177	7,36	12,36
410	400	5,0	5 „	209	8,77	13,77
500	550	5,0	5 „	148	6,22	11,22
620	600	5,0	7 „	223	9,28	14,28
550	550	5,0	7 „	235	9,77	14,77

III. Behandlungsversuche während der Dauerinfusion

Während einer akuten Vergiftung nach einzeitiger Verabreichung der Präparate gelingt es kaum, mit dem bekanntesten Antidotstoff Atropin, auch in hohen Dosierungen, einen tödlichen Ausgang zu verhindern. Bei unseren Versuchen einer protrahierten Vergiftung bestand die Hoffnung, spezifische Antidotwirkungen besser bewerten zu können.

In dieser Versuchsreihe mit E 605 haben wir nur den Erfolg der künstlichen Beatmung geprüft. Da infolge des Geräusches der Atempumpe die auskultatorische Kontrolle der Pulsfrequenz nicht möglich war, wurde, wenn die Palpation eine Abschwächung der Herztätigkeit erkennen ließ, ein Fenster im Thorax angelegt und die Herzfrequenz direkt bis zum Herzstillstand beobachtet. Bei derartigen Versuchen wurden folgende Befunde für die tödliche Titration erhoben (Tab. 3).

Tabelle 3. *Toxicität bei Beatmung*

Gewicht in g	Dosierungsgeschwindigk. mg/kg/Std	letale Dosierung	
		mg/kg	in min
440	15	40,9	163
570	15	79,3	320
450	25	49,6	118
450	25	37,5	89
	im Mittel	52 mg/kg = 6fache letale Dosis ohne Beatmung	

Die Beatmung allein schwächte die Toxicität auf ein Sechstel ab. Die Atemlähmung hat also wohl einen wesentlichen Anteil am Vergiftungsmechanismus.

C. Versuche mit E 600 (Paraoxon)

Diese Verbindung, deren höhere Wasserlöslichkeit eine leichtere Manipulation gestattet und deren größere Beständigkeit in wäßriger Lösung eine gleichmäßigere Wirkung auch bei langdauernden Infusionen erwarten ließ, wurde in der gleichen Weise wie E 605 geprüft.

I. Titration der tödlichen Dosis

Die Zahlenwerte aus Tab. 4 gestatten, wenn man die mit * gekennzeichneten Versuche ausklammert, weil dabei trotz sehr langer Versuchsdauer noch keine tödliche Wirkung eingetreten war, die Berechnung einer *mittleren tödlichen Dosis von 0,77 ± 0,26 mg/kg*. Die Werte

Tabelle 4. *E 600-Titration am Meerschweinchen i. v.*

Gewicht g	mg/kg/Std	letale Dosierung	
		in min	mg/kg
600	1,5	56	1,4
800	1,12	30	0,56
1000	0,96	40	0,64
650	0,67	80	0,90
500	0,25	210	0,84
550	0,25	218	0,91
500	0,25	135	0,57
530	0,20	208	0,70
520	0,20	171	0,58
550	0,16	153	0,40
440	0,15	428	1,08
630	0,15	204	0,51
450	0,13	426	0,92
520	0,13	342	0,74
700	0,12	252	0,50
420	0,10	620	1,03
420	0,10	> 606	> 1,20*
750	0,08	> 360	> 0,47*

lassen auch hier eine erhebliche Streuung erkennen. Keinesfalls liegen die höchsten Werte bei den niedrigen Dosierungsgeschwindigkeiten, so daß auch hier mit diesem Verfahren *keine Elimination* nachgewiesen werden konnte, die sich in mg/kg/Std berechnen ließe. In der kurzen Zeit von 3—7 Std scheint die Elimination noch keine Rolle zu spielen. Bei diesen Versuchszeiten zeigte sich, daß die Pulsfrequenz etwa gleichzeitig mit der Atemfrequenz unter normale Werte abzusinken beginnt.

II. Nachtitration bei vorbehandelten Meerschweinchen

Die Versuchstiere erhielten 0,25 bzw. 0,30 mg/kg E 600 intraperitoneal, d. h. etwa 30 bzw. 40% der letalen Dosis. Nach 1—7 Tagen erfolgte die Nachtitration der „Auffülldosis" (Tab. 5). Die Gesamtdosis

liegt in den ersten beiden Tagen sogar zum Teil unter dem normalen Titrationswert (vgl. Tab. 4), d. h. es handelt sich wohl um eine durch nachwirkende Schäden verstärkte Toxicität im Sinne einer dynamischen Kumulation. Vom 4. Tag ab lag die Gesamtdosis im Bereich von 0,8—1,2 mg/kg d. h. die Vordosis scheint schon völlig eliminiert gewesen zu sein.

Tabelle 5. *E 600-Vorinjektion und Nachtitration*

Gewicht in g	Vorinjektion i. p.		letale Nachdosierung		letale Gesamtdosierung mg/kg
	mg/kg	Zeit vorher	in min	mg/kg	
760	0,25	24	300	> 0,27	> 0,52
700	0,30	48	115	0,16	0,46
650	0,25	24	300	> 0,40	> 0,65
700	0,30	48	300	0,46	0,76
650	0,25	24	122	0,14	0,37
650	0,30	48	270	0,47	0,77
670	0,30	7 Tg.	145	0,61	0,91
650	0,30	7 „	210	0,89	1,19
650	0,30	4 „	129	0,54	0,84
530	0,30	4 „	229	0,95	1,25
410	0,4	4 „	150	0,625	1,03
410	0,4	4 „	189	0,786	1,19

Tabelle 6. *Atropinbehandlung während E 600-Infusion*

Gewicht in g	Infusionsgeschwindgk.	Atropindosis		E 600-letal		wievielfach let. Dosis
	mg/kgStd	mg/kg	in Teildos.	mg/kg	min	
400	0,50 (180 min)					
	1,14 (40 min)	14,0	7	2,26	220	3×
480	0,40	10,0	5	0,81	122	1×
480	0,30 (370 min)					
	0,80 (140 min)	22	11	3,65	510	5×
410	0,30 (180 min)					
	0,80 (30 min)	14	7	1,43	219	2×

III. Behandlungsversuche während der Dauerinfusionen

1. Atropinbehandlung. Atropin wurde vor Beginn der Infusion und danach alle 20—30 min in einer Dosis von 2 mg/kg intraperitoneal, später nur alle 60 min subcutan verabreicht. Die Ergebnisse in Tab. 6 zeigen, daß die tödliche Dosis (vgl. letzte Spalte), mit Ausnahme eines Versuches, 2—5mal höher liegt als ohne Atropinisierung. Der Tod erfolgte in diesen Versuchen wieder unter Atemlähmung. Die Pulsfrequenz lag wenige Minuten vor dem Atemstillstand noch über 100, meist noch gegen 200. Daraus könnte man wohl schließen, daß bei der letalen Dosierung am nicht atropinisierten Tier noch keine der Atemlähmung parallel gehende zentrale Vasomotorenhemmung mitspielt.

2. Lanthanbehandlung. Nach Bamann u. Mitarb. vermögen Lanthansalze wie Phosphatasen die Spaltung von Phosphorsäureestern katalytisch zu beschleunigen. Es war daher die Frage entstanden, ob auch Lanthanverbindungen in vivo eine Entgiftung von Phosphorsäureestern zu fördern bzw. das phosphorylierte Esteraseferment zu reaktivieren vermögen. Nach Beobachtungen von Vincke können Lanthansalze wie die Salze anderer seltener Erden die Blutgerinnung verhindern und ohne toxische Nebenwirkungen intravenös verabreicht werden. Wir gaben Lanthannitrat in Dosen von 20—80 mg/kg alle 20 min intraperitoneal während der Infusion von E 600. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 7 zusammengestellt. Eine deutliche Abschwächung

Tabelle 7. *Lanthangaben auf E 600-Toxicität*

Gewicht g	Lanthandosierung			letale E 600-Dosierung	
	mg/kg	Anzahl	Ges. Dosis mg/kg	min	mg/kg
680	20	8	160	188	0,65
540	20	6	120	133	0,60
500	30	7	210	210	0,79
650	40	11	440	226	0,84
570	40	11	440	222	0,94
650	60	8	480	196	0,73
600	60	8	480	193	0,77
730	80	7	560	149	0,49
670	80	7	560	148	0,54

der Giftwirkung von E 600 ist nicht erkennbar. Bei der mittleren Lanthandosis (40 mg/kg) war die tödliche E 600-Dosis am höchsten, aber noch kaum oberhalb des aus Tab. 4 berechneten Mittelwertes (0,77 mg/kg). Bei der höchsten Lanthandosis von 80 mg/kg war die E 600-Wirkung sogar verstärkt. Vielleicht durch die Eigentoxicität von Lanthan, von dem immerhin 560 mg/kg in $2^1/_2$ Std verabreicht worden waren.

D. Versuche mit Eserin

Eserin zählt, wie die Alkylphosphate, zu den Esteraseblockern und weist in seinem Wirkungsbild große Ähnlichkeiten mit deren Giftwirkungen auf. In vitro-Versuche lassen eine bessere Reversibilität der Eserinbindung an die Esterase erwarten, ebenso wie die experimentelle Erfahrung, daß eine unter Atropinschutz durchgeführte Eserinvergiftung viel schneller abklingt als die der Alkylphosphate. So war eine vergleichende Eliminationsprüfung für das Eserin bei Dauerinfusion von Interesse. Die Untersuchungen sollten auch zeigen, ob dabei die Eserinvergiftung durch Beatmung und Atropinbehandlung ebenso günstig wie bei der Vergiftung mit E-Präparaten beeinflußt wird.

Die unter verschiedenen Dosierungsgeschwindigkeiten erzielten Titrationsergebnisse sind in Tab. 8 zusammengestellt.

Tabelle 8. *Titration der letalen Eserindosis am Meerschweinchen*

Gewicht g	Infus. Geschwindgk. mg/kg/Std	Behandlung	Letale Eserindosis mg/kg	Letale Eserindosis min	Frequenzabnahme
500	2,0	ohne	2,0	60	Puls vor Atmung
480	1,0	„	1,48	88	„ „ „
630	1,0	„	1,53	93	„ „ „
570	0,75	„	2,67	214	„ „ „
480	0,75	„	2,37	189	„ „ „
440	0,60	„	1,38	137	Atmung vor Puls
440	0,60	„	3,26	320	Puls vor Atmung
720	0,5	„	2,70	225	„ „ „
650	0,5	„	1,41	169	„ „ „
550	2,0	künstl.	1,73	52	
440	1,0	Beatmung	4,97	298	
500	1,0	„	3,03	182	
520	1,0	„	3,25	195	
460	0,5	„	2,4	290	
560	0,5	„	2,25	270	
		Atropin			
555	7,0	17 mg/kg	21,6	185	Atmung vor Puls
570	6,6	6	10,4	95	„ „ „
410	6,0	8	7,75	77	„ „ „
540	5,0	12	19,4	245	„ „ „
500	5,0	8	5,14	63	„ „ „
620	4,0	18	21,2	317	„ „ „
520	4,0	6	4,5	65	„ „ „
650	3,0	10	12,9	215	„ „ „
420	5,0 (180 min)	14	(>15)		
	+21,0 (19 min)		21,6	199	„ „ „
510	4,0 (300 min)	14	(>20)		
	+ 8,0 (80 min)	2	(>30,7)	>380	nicht tödlich
510	3,0 (300 min)	14	(>15)		
	+ 6,0 (63 min)	4	21,3	363	Atmung vor Puls
470	2,0 (300 min)	18	(>10)		
	+10,0 (71 min)		21,7	371	„ „ „

Nach statistischer Auswertung kann daraus die tödliche Dosis abgeleitet werden:

I. *Eserin*
$2{,}09 \pm 0{,}69$ mg/kg

II. *Eserin und Atropin*
$16{,}54 \pm 8{,}0$ mg/kg

III. *Eserin und künstl. Beatmung*
$2{,}94 \pm 1{,}14$ mg/kg

Signifikanz:
I. und II. $t = 5{,}34$ $p < 0{,}001$
I. und III. $t = 1{,}81$ $p > 0{,}05$

Die tödlichen Dosen streuten unter allen Versuchsbedingungen stark. Die Unterschiede der Toxicität mit und ohne Beatmung sind

nicht statistisch gesichert, dagegen wurde die Toxicität durch die Atropinbehandlung auf etwa ein Achtel abgeschwächt. Bei der einfachen Eserininfusion war die Schädigung offensichtlich stärker auf die Herztätigkeit gerichtet als auf die Atmung (entgegen den Beobachtungen mit E 605). Demgemäß wirkte sich auch die Beatmung nicht so positiv aus, während die Toxicität bei E 605 durch Beatmung auf ein Sechstel abgeschwächt wurde. Atropin verhinderte die frühzeitige Pulsverlangsamung und schwächte die Toxicität ab. Der Tod erfolgte nun durch Atemlähmung, nicht über eine Herzschädigung.

Auffallend ist in den Versuchen, daß unter keinen Bedingungen bei den verschiedenen Dosierungsgeschwindigkeiten eine Elimination erkennbar wurde. Eine Beziehung der tödlichen Dosis zur Infusionsgeschwindigkeit ist nicht festzustellen, höchstens bei der künstlichen Beatmung, wo die Toxicität bei langsamerer Infusion mit verzögerter tödlicher Wirkung eher größer war. Dies läßt sich vielleicht so deuten, daß die stundenlange künstliche Beatmung noch einen zusätzlichen schädigenden Faktor darstellte.

E. Erörterung der Befunde

Die konstante intravenöse Infusion der verschiedenen Esterase-blocker führte bei wechselnder Dosierungsgeschwindigkeit zur Ermittlung von tödlichen Dosen, die im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte liegen. Es zeigte sich dabei aber keine Abweichung der tödlichen Dosis bei besonders langsamer Infusion, woraus man auf eine sicher meßbare Elimination in den ersten 3—6 Std hätte schließen können. Nur bei Vorinjektion einer tödlichen Teildosis und Nachtitration der Auffülldosis war ab 4. bis 7. Tag mit Sicherheit eine Elimination der Vordosis (30—40% letal) erkennbar.

Diese Feststellung entspricht einigen einleitend zitierten Erfahrungen, die mit anderer Methode gewonnen wurden. Allerdings dürften unsere Eliminationswerte geringer sein als die von Wirth an Mäusen bei täglich wiederholten Teilgaben (ein Achtel letal) gefundenen. Diese Teildosen wurden anscheinend weitgehend eliminiert. Kewitz, Wilson u. Nachmansohn haben aber gerade neuerdings auch bei Bestimmung der Esteraseaktivität im Gehirn und Zwerchfell von Mäusen, welche hohe toxische Teildosen von E 600 überstanden hatten, gezeigt, daß die Esterase mehrere Tage blockiert bleibt und z. T. nur durch Fermentneubildung reaktiviert zu werden scheint. Aus ihren Versuchen geht übrigens auch hervor, daß die im ganzen Organ nachgewiesene hochgradige Blockierung der Esterase noch keineswegs die Lebensfähigkeit der Tiere beeinträchtigen muß, besonders wenn die Inaktivierung bei mehrzeitigen Dosierungen erzielt wurde. Insofern sind also die einfacheren Bestimmungen der praktischen „Kumulationsneigung" bei wiederholten Injektionen doch kein direktes Maß für die Eliminationsfähigkeit. Es mag auch beachtet werden, daß die einmaligen Injektionen hoher Teildosen vielleicht gar nicht so sehr eine systematische spezifische Blockierung der Esterase bedingen, sondern daß dabei auch ein gewisser Anteil „paraesteratisch" gebunden

sein mag und daß dieser Teil *vor* einer weiteren Besetzung der Esterase selbst schon aufgespalten werden kann.

An unseren Ergebnissen befremdet allerdings die Feststellung, daß auch das Eserin keine deutlichere Eliminationsfähigkeit zeigte. Im allgemeinen gilt Eserin als noch relativ leicht auswaschbar und im Organismus leichter zerstörbar als die Phosphorsäureester[1]. Daraus könnte man auch in üblicher Weise erklären, daß z. B. bei parenteraler Injektion von Eserin an Mäusen die Krampferregung nach Grenzdosen in wenigen Minuten eintritt und abklingt. Freilich bleibt hier, wie bei den Vergiftungen mit den Phosphorsäureestern, der Einwand bestehen, daß die zentralnervöse Wirkung nicht unbedingt mit der Esteraseblockung allein zu erklären sei. In unseren Versuchen mit Eserin am narkotisierten Tier waren jedenfalls auch periphere Kreislaufeffekte am tödlichen Ausgang beteiligt, die vielleicht — esterasebedingt — weniger leicht reversibel sein mögen als andersartige Reaktionen.

Eine besondere Beachtung möchten wir auch der Frage einer Konvertierung des Parathion widmen.

Von Diggle u. Gage sowie von Myers, Mendel u. a. (auch Wirth u. Schrader vertreten diese Auffassung) ist angenommen worden, daß das Parathion (Thiophosphorsäureester) in vivo, aber auch schon als Lösung in vitro in den entsprechenden Phosphorsäureester (Paraoxon) oder auch in eine isomere S-äthyl-Verbindung übergehen kann. Das Parathion soll in vitro die Esterase kaum hemmen, in vivo aber in gleichen Dosen wie Paraoxon, nur zeitlich mit größerer Latenz, weil es erst konvertiert werden muß, um überhaupt die Esterase zu blockieren (gemessen an Homogenaten von Rattenhirn). Mit Paraoxon verunreinigte Parathion-Präparate sollen auch in vitro schon wirksam sein. Myers u. Mitarb. haben insbesondere das verschiedene Verhalten von Parathion und Paraoxon der sogen. echten und Pseudo-Cholinesterase gegenüber beschrieben und aus dem abgewandelten Verhalten des Parathion bei in vivo-Versuchen auf eine entsprechende Umwandlung geschlossen.

Wenn Parathion, um wirksam zu werden, in vivo überhaupt erst in Paraoxon oder ein S-äthyl-Isomeres umgewandelt werden muß, welche 500 bzw. 111mal wirksamer auf die Esterase sein sollen, dann müßte bei einer Infusion die Wirksamkeit von E 605 um so größer werden, je langsamer die Zufuhr erfolgt. Wir fanden aber bei allen Infusionsgeschwindigkeiten eine mittlere Dosis von 8,6 mg/kg gegenüber Paraoxon 0,77 mg/kg, d. h. die Wirksamkeit war etwa 11mal geringer. Wenn man die Annahme einer Konvertierung aufrecht erhält, wofür manche chemischen Gründe sprechen mögen, dann müßte man wohl annehmen, daß diese Konvertierung so schnell erfolgt, daß sie bei der

[1] Meyer hat mit Hilfe einer chemischen Nachweismethode das Schicksal von Eserin im Organismus verfolgt. Dabei zeigte sich allerdings, daß — nach s.c. oder i.m. Injektion von 2 mg/kg Eserin an Meerschweinchen — die Ausscheidung von Eserin im Urin erst nach 3 Std ihren Maximalwert erreicht und über 2 Tage andauert. Insgesamt wurden 30% der injizierten Eserinmenge ausgeschieden.

längeren Infusionszeit bis zum Tode schon in den ersten 30 min abgeschlossen wäre und daß sie vielleicht auch nicht total in einer Umwandlung in Paraoxon besteht, denn sonst müßte ja die gleiche tödliche Dosis als Endwert erzielt werden wie mit E 600. Vielleicht erfolgt auch eine teilweise Umwandlung in das S-äthyl-Isomere. Aus unseren Ergebnissen können wir noch keine sicheren Aussagen darüber machen. Unveröffentlichte Versuchsergebnisse von Erdmann und Heye am isolierten Darm wecken allerdings weitere Bedenken.

Auch eine andere Umsetzungsmöglichkeit der Phosphorsäureester in vivo hätte, wenn diese praktisch für die Erklärung der Wirkungsweise dieser Stoffe eine Rolle spielt, bei der langsamen Infusionsgeschwindigkeit in unseren Versuchen, einen deutlicheren Einfluß zeigen müssen. Nach Enders soll nämlich die zentral lähmende Wirkung von E 605 und E 600 entgegen den Erregungssymptomen (als Folge der Esterase-blockung) auf einer Abspaltung des lähmend wirkenden p-Nitrophenols beruhen. Diese Hypothese hat an sich schon deswegen keine große Wahrscheinlichkeit, weil z. B. der verwandte Phosphorsäureester „Systox" (Diäthylthiophosphorsäureester des Äthylthioglykol), der kein Nitrophenyl-Esterpräparat ist, ebenfalls in hohen Dosen lähmende Wirkungen zeigt. Wenn die Spaltung des Moleküls für die Lähmung von Bedeutung wäre, dann dürfte bei so langsamer Infusion, wie wir sie wählten, eigentlich kaum eine lähmende Wirkung eintreten bzw. die Elimination müßte deutlicher erkennbar sein, weil das Nitrophenol im Organismus nicht verankert und leicht entgiftet werden kann. Unsere Versuche zeigten aber das Gegenteil.

Zur Frage der Wirkungsweise gestatten unsere Befunde nur insofern einige Schlußfolgerungen, als wir bei den Phosphorsäureesterpräparaten eine frühere und stärkere Hemmung der Atmungsfunktion als der Herzfunktion feststellen konnten, während bei der Esteraseblockung durch Eserin die Herzhemmung im Vordergrund der Vergiftungserscheinungen stand. Demgemäß wurde Eserin auch stärker durch die Atropinbehandlung abgeschwächt, aber weniger durch die künstliche Beatmung, als dies bei der Phosphorsäureesterwirkung der Fall war. Eine starke Herzhemmung wurde übrigens von Dahlbom, Holmstedt u. a. an nichtbetäubten Meerschweinchen bei der intravenösen Infusion von Tabun unter Titration bis zum Herzstillstand beobachtet. Es wurden hierfür 0,69 mg/kg als tödliche Dosis ermittelt. Bei sehr starker Atropinbehandlung (100 mg/kg) war die tödliche Dosis auf 1,38 mg/kg erhöht, die Toxicität also auf die Hälfte herabgesetzt. Verschiedene Phenothiazinderivate waren mit ein Zehntel der Atropindosis ebenso wirksam.

Die herzhemmende Wirkung dürfte vermutlich über eine Esterase-blockung im Sinne einer parasympathisch-muskarinartigen Wirkung

mit Kollapserscheinungen zu erklären sein. Für die Atemlähmung müssen wir auf Grund weiterer Beobachtungen mit Antidotstoffen (Bethe u. Erdmann, unveröffentlichte Versuche) einen zentralen Angriff annehmen.

Zusammenfassung

1. Bei intravenösen Infusionen mit verschiedenen Dosierungsgeschwindigkeiten konnten folgende mittlere tödliche Dosen an Meerschweinchen festgestellt werden:

E 605 (Parathion) $= 8{,}6 \pm 1{,}6$ mg/kg
E 600 (Paraoxon) $= 0{,}77 \pm 0{,}26$ mg/kg
Eserin (Physostigmin) $= 2{,}09 \pm 0{,}69$ mg/kg.

2. Es ließ sich dabei keine Elimination, selbst bei vielstündiger Infusionsdauer erkennen. Nur wenn die E-Präparate mit 30—40% letaler Dosis vorinjiziert wurden, ergab sich bei der Nachtitration der Auffülldosis erst ab 4.—7. Tag eine sichere Elimination der Vordosis.

3. Während des langsamen Vergiftungsablaufs konnte der Wert von Behandlungsmaßnahmen festgestellt werden:

künstliche Beatmung schwächte die Toxicität von E 605 auf ein Sechstel, die Toxicität von Eserin aber nicht signifikant ab.

Atropinbehandlung schwächte die Toxicität von E 600 nur auf einhalb bis ein Fünftel ab, die Toxicität von Eserin jedoch auf ein Achtel.

Lanthansalzbehandlung war ohne Einfluß auf die Wirkung von E 600.

4. An der tödlichen Vergiftung durch die Esteraseblocker sind Lähmungen der Atmung und des Kreislaufs entscheidend beteiligt: bei den Phosphorsäureestern wohl vorwiegend eine Atemlähmung, bei der Eserinvergiftung wohl besonders eine Kreislaufwirkung. Das verschiedene Verhalten gegenüber Beatmung und Atropinbehandlung gestattet diesen spezifischen Anteil zu beurteilen.

Literatur

Augustinsson, K. B., u. G. Heimburger: Acta chem. scand. **8**, 753 u. 762 (1954); refer. J. Pharmacol. et Pharmac. **6**, 911 (1954). — Bamann, E. u. Mitarb.: Klin. Wschr. **1954**, S. 588; **1955**, S. 143. — Bauer, H., u. K. Fromherz: Klin. Wschr. **1933**. 973. — Bauer, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **172**, 699 (1933). — Dahlbom, R., H. Diamant, B. Holmstedt u. a.: Acta Pharmacol. et Toxic. **9**, 163—167 (1953). — Diggle, W. M., u. J. C. Gage: Biochem. J. **49**, 491 (1951); Nature **168**, 998 (1951). — Enders, A.: Arch. int. de Pharmcodyn. et de Thér. **89**, 169 (1952). — Enders, A., u. H. Ruf: Ebenda **90**, 175 (1952). — Hatcher, R. A.: Arch. int. Med. **10**, 268 (1912). — Hauptstein, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **126**, 121 (1927). — Hecht, G., u. W. Wirth: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 264 (1950). — Heymans, C., A. Pochet u. H. van Houten: Arch. int. de

Pharmacodyn. et de Thér. **104**, 293—332 (1956). — Hoffmann, G., u. E. Witte: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 221—222 (1950). — Hoskin, F. C. G.: Canad. J. Biochem. Physiol. **34**, 75 (1956). — Kewitz, H., u. J. B. Wilson: Arch. of Biochem. a. Biophys. **60**, 261—263 (1956). — Kewitz, H., u. D. Nachmannsohn: Arch. of Biochem. a. Biophys. (im Druck). — Koelle, G. B., u. A. Gilman: J. Pharm. exper. Ther. **87**, 435 (1946); zit. nach O. Riesser: Muskelpharmakologie, Bern 1947, S. 87. — Koelle, G. B., u. A. Gilman: J. Pharm. exper. Ther. **95**, 166—216 (1949); pt. II (Pharmac. Rev.). — Lendle, L.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **169**, 392 (1933). — Lendle, L., u. A. Beck: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **164**, 188 (1932). — Meyer, F.: Pharmazie **5**, 420 (1950). — Myers, D. K., B. Mendel, A. R. Gersmann u. J. A. Ketelaar: Nature **170**, 805—807 (1952). — Vincke, E., u. H. A. Oelkers: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **188**, 465 (1938). — Wirth, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 547 (1949); **217**, 144 (1953).

Professor Dr. L. Lendle, Pharmakolog. Institut, Göttingen, Geiststr. 9

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 223—227 (1957)

Aus der Dermatologischen Universitätsklinik Zürich
(Direktor: Prof. Dr. G. Miescher)

Die Beeinflussung der bactericiden Wirkung des Hautfettes durch die Aminosäuren der Hautoberfläche*

Von
G. Miescher und M. Speck

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Dezember 1956)

In bisherigen Arbeiten[2, 3, 4] über die Selbstdesinfektion der Haut wurde festgestellt, daß der ätherlösliche Teil des Hauttalges, das Hautfett (HF), eine stark antibakterielle Wirkung entfaltet. In HF eingebrachte Streptokokken sind nach wenigen Minuten abgetötet, während sie in Paraffinöl auch nach 24 Std noch lebensfähig bleiben. Dasselbe gilt mit etwas längerer Abtötungszeit auch für Escheria Coli und weiße und gelbe Staphylokokken. Die Ursache der Wirkung bilden die im HF enthaltenen Fettsäuren und ihre Ester.

Mit diesen Befunden steht die Tatsache im Widerspruch, daß auch die gesunde Haut oft pathogene Keime beherbergt und daß nicht selten gerade im talgreichen Inhalt von Follikeltaschen Staphylokokken gefunden werden. Dies spricht dafür, daß im natürlichen Milieu Faktoren wirksam sind, welche die bactericide Wirkung des HF hemmen. In Betracht kommen in erster Linie die wasserlöslichen Anteile der im Hauttalg vorhandenen Substanzen. Es sind das vor allem Aminosäuren (AS), welche, wie das aus neueren Untersuchungen hervorgeht[1, 5, 6, 7], in beträchtlicher Menge an der Hautoberfläche auftreten. Sie entstammen in erster Linie dem Verhornungsprozeß.

Wir haben darum experimentell den Einfluß der an der Hautoberfläche gefundenen AS auf die Bakterizidie des HF geprüft. Über unsere ersten Untersuchungen haben wir auf der Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 1956 in Wien berichtet.

Wir verwendeten ein HF, das durch Ätherextraktion getragener Nylonleibchen gewonnen worden war. Als empfindliches biologisches Objekt wählten wir einen Stamm von Streptococcus haemolyticus.

Die Bakterien wurden mit Glassand gut vermischt und je eine Öse dieses Gemisches in das HF bzw. HF-AS-Gemisch verbracht und 1 min lang durchgemischt. Aus der Mischung wurde in zunehmenden zeitlichen Abständen von 5 min bis 4 Std je eine Öse in Tweenbouillon verimpft und das Wachstum nach 12, 24 und 48 Std geprüft.

* Herrn Professor Dr. Rolf Meier zum 60. Geburtstag gewidmet.

In einem Vorversuch war bei Zusatz eines AS-Gemisches in Konzentrationen von 2,5, 5 und 10% zu verdünntem HF bei Staphylococcus aureus, Escheria Coli und Streptococcus haemolyticus durchwegs eine Verzögerung der HF-Wirkung erzielt worden, und zwar um so stärker, je höher der Gehalt an AS war.

In den vorliegenden Versuchen wurde das HF mit Paraffinöl auf eine Konzentration von 10% verdünnt und dieser Verdünnung die AS einzeln oder als Gruppe in der gleichen Konzentration von 10% zugefügt. In den Versuchsreihen wurde folgende Versuchsanordnung getroffen:

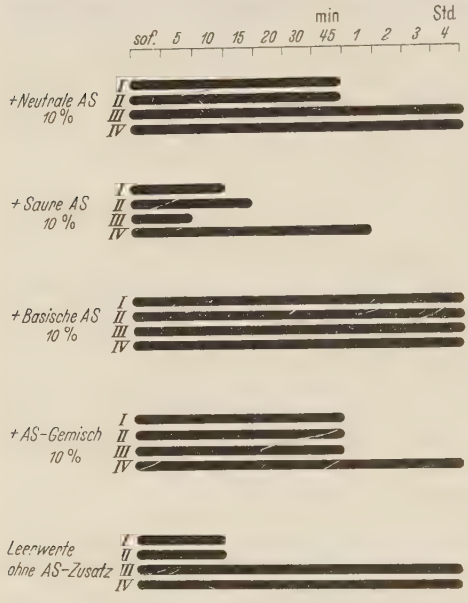


Abb. 1. I Bakterientest in HF 1:10; II Bakterientest in HF 1:10 + Wasser; III Bakterientest in Wasser; IV Bakterientest in Paraffinöl

I. AS-HF-Gemisch ohne Wasserzusatz,
II. AS-HF-Gemisch mit Wasser,
III. AS ohne HF in Wasser,
IV. AS ohne HF in Paraffinöl.

Als Vergleich (Leertest) wurde der Versuch mit HF oder Wasser oder Paraffinöl ohne AS-Zusatz durchgeführt. Jeder Versuch wurde 3—6mal angesetzt. Die Angaben in den Tabellen bedeuten Durchschnittswerte.

Die an der Hautoberfläche nachgewiesenen AS lassen sich in Gruppen aufteilen:

1. Neutrale AS. Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Phenylalanin, Tyrosin, Dioxyphenylalanin, Prolin, Oxyprolin, Tryptophan, Methionin.

2. Saure AS. Asparaginsäure, Glutaminsäure.

3. Basische AS. Ornithin, Lysin, Arginin, Citrullin, Histidin.

4. Aminosäuregemisch in der Zusammensetzung nach den Angaben von Spier u. Pascher.

A. In einer ersten Versuchsreihe wurden die einzelnen Gruppen der AS und ein AS-Gemisch nach Spier u. Pascher untersucht, wobei dessen Zusammensetzung an Aminosäuren nach den Mittelwerten der von diesen Autoren ausgeführten Analysen angenommen wurde.

Aus Abb. 1 geht folgendes hervor: Die Gruppe der *neutralen* und die Gruppe der *basischen AS* sowie auch das *AS-Gemisch* ergaben in *verdünntem HF* eine deutliche Hemmung der bactericiden Wirkung des HF, wobei die Gruppe der basischen AS die stärkste Hemmung aufweist, indem auch nach der längsten Verweildauer (4 Std) im HF-AS-Gemisch die Mikroben noch lebensfähig waren.

Bei der Gruppe der sauren AS fehlt die Hemmung, indem sie dieselbe Abtötungszeit aufweist wie bei Verwendung von HF ohne AS.

Ein Zusatz von 10—50% *Wasser* zum AS-HF-Gemisch erwies

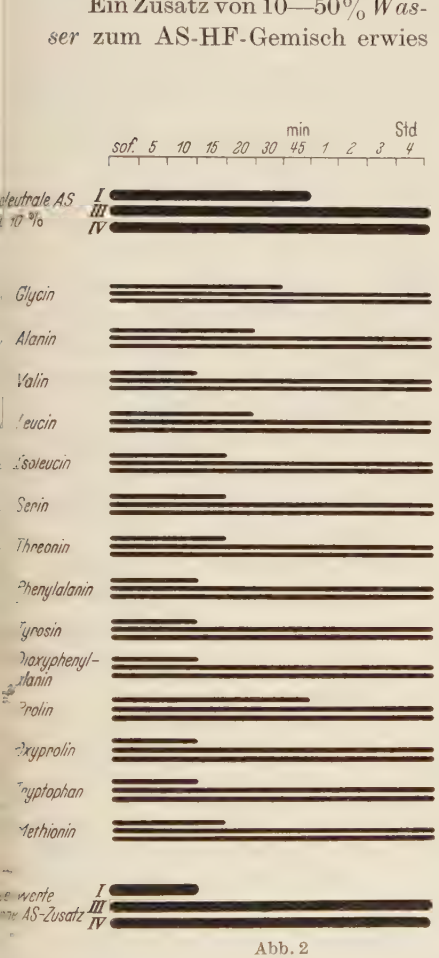


Abb. 2

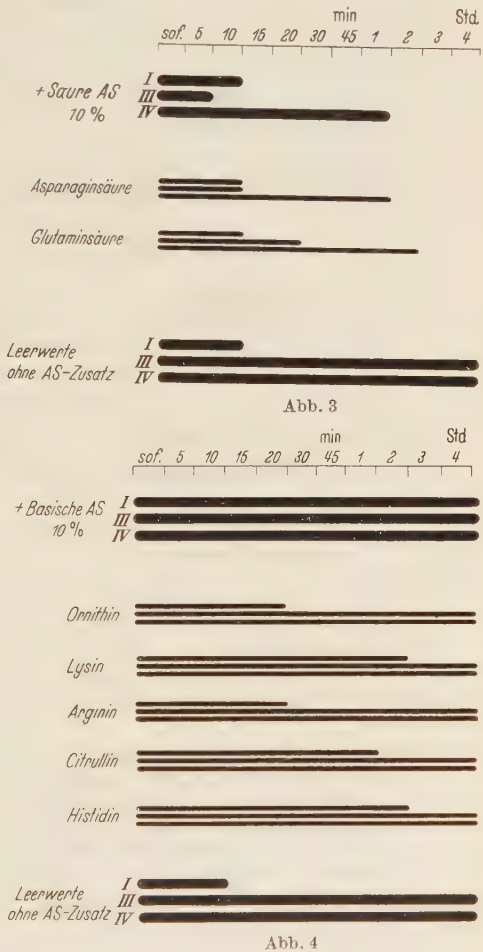


Abb. 3

Abb. 4

Abb. 2—4.
I Bakterientest in HF 1 : 10; III Bakterientest in Wasser; IV Bakterientest in Paraffinöl

sich als praktisch ohne Einfluß (in der Abb. 1 sind nur die Versuche mit 50% Wasser eingetragen).

Die Wirkung der *AS in wäßriger Lösung ohne Gegenwart von HF* ergab folgendes:

1. neutrale und basische AS: keine bactericide Wirkung.
2. saure AS wirken stark bactericid (Abtötung nach 5 min).
3. das AS-Gemisch wirkt ebenfalls bactericid (Abtötung nach 45 min).

In *Paraffinöl* sind die *basischen* und *neutralen* AS-Gruppen sowie auch das AS-Gemisch ohne Einfluß auf die Bakterien, auch wenn Wasser in der Menge von 10 und 50% zugegeben wird (in Abb. 1 nicht aufgeführt). Die *sauren AS* zeigen im Gegensatz dazu eine deutliche bactericide Wirkung (bis 1 Std).

B. In einer zweiten Serie von Versuchen wurden die einzelnen AS der drei Gruppen einzeln geprüft:

a) Neutrale AS (Abb. 2). Glycin, Alanin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Prolin und Methionin verzögern die bactericide Wirkung des HF, am meisten Prolin, die übrigen neutralen AS, Valin, Phenylalanin, Tyrosin, Dioxyphenylalanin und Tryptophan lassen in verdünntem HF keine Wirkung erkennen, sind also an der Wirksamkeit der neutralen AS-Gruppe unbeteiligt. In Wasser und Paraffinöl zeigt sich gleiches Verhalten wie bei der gesamten AS-Gruppe.

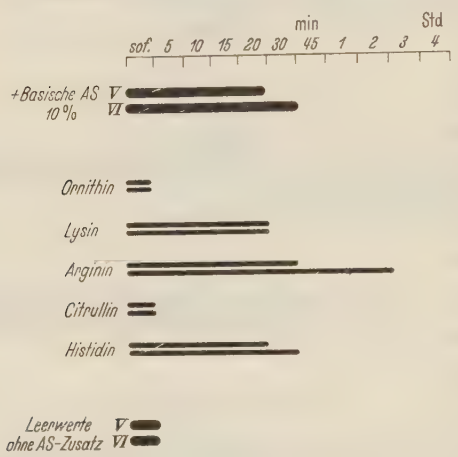


Abb. 5. V Bakterientest in unverdünntem HF; VI Bakterientest in unverdünntem HF + 10% Wasser

b) Bei den sauren AS (Abb. 3), welche, wie das Verhalten in Wasser beweist, ausgesprochen bactericid wirken, tritt in der Mischung mit HF kein deutlicher Einfluß hervor, weder im Sinne der Hemmung noch der Förderung, möglicherweise weil sich in diesem Falle zwei entgegengesetzte Wirkungen aufheben. Auch in Paraffinöl ist die bactericide Wirkung der sauren AS erkennbar.

c) In der Gruppe der *basischen AS* (Abb. 4) zeigen die einzelnen Vertreter ein verschiedenes Verhalten. So bewirken Ornithin und Arginin in verdünntem HF nur eine geringe Verzögerung der Abtötung der Bakterien, währenddem diese wesentlich ausgeprägter ist bei Lysin, Histidin und Citrullin. In Wasser und Paraffinöl sind die basischen AS unwirksam.

C. Orientierungshalber wurde in einer letzten Versuchsreihe die Wirkung der in verdünntem HF am stärksten hemmenden *basischen AS* mit *unverdünntem HF* geprüft (Abb. 5). Auch bei dieser Versuchsanordnung kommt die unterschiedliche Wirkung der einzelnen AS zur Geltung. Während Ornithin und Citrullin ohne Wirkung bleiben, zeigen Lysin, Arginin und Histidin die gleich starke Hemmung wie das Gesamtgemisch der basischen AS. Citrullin verhält sich in beiden Versuchsreihen nicht übereinstimmend, vermutlich wegen der höheren Konzentration des HF im zweiten Versuch.

Zusatz von 10% Wasser zu diesen AS-Gemischen ergibt beim Arginin eine Steigerung der Hemmwirkung, während bei den übrigen das Ergebnis sich nicht ändert.

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß die bactericide Wirkung des HF auf die Mikroben durch eine Anzahl von AS ganz erheblich gehemmt wird, und daß auch das AS-Gemisch hemmend wirkt. Damit ist zweifellos eine wesentliche Abschwächung der bactericiden Wirkung des HF im Bereich der Hautoberfläche erklärt. Welcher Art diese Wirkung ist, bleibt zunächst eine offene Frage, ebenso bleibt offen, ob noch andere Faktoren einen hemmenden Einfluß ausüben.

Zusammenfassung

Die bactericide Wirkung des Hautfettes wird durch ein Gemisch an der Oberfläche der Haut nachgewiesener freier Aminosäuren erheblich gehemmt.

Die hemmende Wirkung ist in erster Linie bedingt durch die basischen, in geringerem Grade durch die neutralen Aminosäuren, während die sauren selber bactericide Eigenschaften besitzen und keine Hemmwirkung erkennen lassen.

Wasserzusatz zu dem HF-AS-Gemisch hat nur geringen oder keinen Einfluß.

Die einzelnen Aminosäuren einer Gruppe verhalten sich nicht gleich. Dies zeigt sich besonders bei den basischen Aminosäuren, wo z. B. Arginin und Histidin stark hemmen, während Ornithin ohne Einfluß ist.

Literatur

[1] Korting, G. W., u. D. Nitz-Litzow: Arch. Dermat. **194**, 405 (1952). — [2] Miescher, G., H. Lincke u. P. Rinderknecht: Dermatologica (Basel) **106**, 76 (1953). — J. Invest. Dermat. **24**, 293 (1955). — [3] Miescher, G.: Dermatologica (Basel) **109**, 65 (1954). — [4] Miescher, G., M. Speck u. P. Rinderknecht: Arch. Dermat. (im Druck). — [5] Rothman, S., and M. B. Sullivan: J. Invest. Dermat. **13**, 319 (1949). — [6] Spier, H. W., u. G. Pascher: Arch. Dermat. **199**, 411 (1955). — [7] Wohnlich, H.: Dermat. Wschr. **1952**, 126; **1953**, 128.

Prof. Dr. G. Miescher, Dermatologische Universitätsklinik, Zürich/Schweiz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 228—235 (1957)

From the Laboratory of Chemical Pharmacology of the National Cancer Institute**
Bethesda, Maryland, U.S.A. (Chief: Dr. M. J. Shear)

Independence of Drug-Induced Damage in Sarcoma 37 and Carotid Blood Pressure in Mice* ***

By
Sachindra N. Pradhan+, Betty Achinstein and Murray J. Shear

(Eingegangen am 14. Dezember 1956)

The many chemical agents that have been found in this Laboratory to be capable of inducing hemorrhage and necrosis in tumors of experimental animals are of various categories, viz., polysaccharides of bacteria, plants and mammals (Shear[16]), other plant products (Greenspan, Leiter and Shear[7]; Leiter, Hartwell, Ullyot and Shear[10]; Belkin and Fitzgerald[6]), and synthetic compounds (Leiter, Hartwell, Kline and Shear[9]).

The mechanisms by which they produce this kind of damage in tumor tissue are not yet clear.

A primary hypotension is one of the explanations offered to account for the action of tumor-necrotizing agents such as the polysaccharide from *S. marcescens* (Shear and Perrault[17]), compounds isolated from podophyllin (Leiter, Downing, Hartwell and Shear[8]) or related to them (Schrecker, Greenberg and Hartwell[15]; Waravdekar, Powers and Leiter[18]), and histamine (Barrett[5]). The theory advanced by Algire[1, 2, 3, 4] and coworkers postulates that: the first effect of such agents is a prolonged hypotension which accounts for circulatory slowing "throughout the host"; that the slowing of blood flow is followed by stasis in vessels of both the tumor and surrounding tissues; and that the consequent anoxia results in tumor damage. This theory was based upon observations on blood flow through capillaries in tumors implanted in skin flaps and through small vessels in the peripheral vascular bed near the tumor; the blood pressure was estimated in these vessels by an indirect method.

For evaluation of the role of systemic blood pressure in the production of tumor damage, we considered it essential to obtain data with a

---

* This paper is dedicated to Professor Rolf Meier, Basle, on the occasion of his 60th birthday anniversary.

** National Institutes of Health, Public Health Service, U.S. Department of Health, Education and Welfare.

*** Preliminary reports (Pradhan, Achinstein and Shear[11, 12]) were given at the Fall 1954 and Spring 1955 meetings of the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

+ Present address: Department of Pharmacology, Howard University School of Medicine, Washington.

method capable of direct measurement of blood pressure in a major artery of the tumor-bearing mouse. A method was, accordingly, devised (PRADHAN, ACHINSTEIN and SHEAR[13]) in which a hypodermic needle was inserted in the carotid artery of the mouse and the systemic blood pressure recorded continuously. Base line determinations were made in normal mice and in mice bearing Sarcoma 37.

This paper presents data on the tumor-damaging activity of a large number of drugs and on the net effect they produced upon carotid blood pressure in the mouse. No correlation was obtained between these two types of effect.

Methods and Materials

CAF_1 mice of both sexes, weighing 20 to 28 grams, were employed. Inasmuch as the same animals could not be used both for recording of blood pressure and for examination of damage to the tumors, separate groups of mice were employed.

Sarcoma 37 was implanted, as a mash, in a hind leg muscle, as in previous work[8]. A single dose of each drug was given, intraperitoneally, on the sixth day of tumor growth. When the initial dose of a drug failed to produce hemorrhage and necrosis in tumors, the dosage was increased; a drug was considered negative only when the tumors were unaffected at a dose level which killed at least a small proportion of the mice. Twenty-four hours after drug administration, the mice were sacrificed*; the tumors were examined grossly and microscopically, as described previously[8], for evaluation of the degree of damage induced in the tumors.

Carotid blood pressure was continuously recorded in normal and in tumor-bearing mice, under urethan or Nembutal anesthesia, and the values (in mm. Hg) read from the calibrated recordings. In this method[13], a 27-gauge needle, inserted in the carotid artery, was fitted directly to a Statham physiological pressure transducer (Model P-23 D) that was attached to a Brush Universal Analyzer; this, in turn, was connected to a Brush Oscillograph on which pressure was recorded by direct-writing pens.

When the blood pressure became stabilized (usually within one-half hour), the drug was injected and its effect on the pressure observed until, in most instances, it returned to the pre-injection level.

Results

The results are summarized in table 1 which gives, for each drug, the activity in producing tumor damage, and the mortality at the corresponding dose levels (columns 2, 3 and 4). The net effect on blood pressure**, determined in separate mice at the dose-ranges shown in column 5, are given in the last column. The presence of 6-day-old Sarcoma 37 did

* *Footnote added in Proof.* In this Laboratory, more chronic types of experiments also have been carried out with some of the drugs used in this study, e.g.: GOLDIN and coworkers [Science **125**, 156 (1957)] found that reserpine prolonged survival of mice bearing Leukemia 1210; and BELKIN and coworkers [Science **125**, 233 (1957)] found that reserpine and chlorpromazine retarded the growth of Sarcoma 37.

** Detailed data on the blood pressure changes will be described in another communication.

Table 1. *Effect of various drugs on Sarcoma 37 and on carotid blood pressure in mice*

Drug	Effect on mice bearing S-37			Effect on blood pressure	
	Dose (μg./g.)	Mortality*	Induced Tumor Damage**	Dose (μg./g.)	Effect
Epinephrine (Adrin, Sharp and Dohme)	3	0/10	0/10	5—10	rise
	4	5/19	3/14		
	5	9/10	1/1		
Levarterenol (Levophed, Winthrop-Stearns)	8	0/10	0/10	5—10	rise
	9	1/30	7/29		
	10	12/29	2/17		
Ephedrine (Nutritional Biochemical)	200	3/20	0/17	200	rise
	300	13/20	0/7		
Amphetamine (Raphetamine, Strasenburgh)	10	0/10	0/10	10—60	rise
	20	0/10	1/10		
	40	0/9	1/9		
	50	2/8	1/6		
	60	11/44	21/33		
	80	3/10	7/7		
Cyclopentamine (Clopane, Lilly)	40	0/10	0/10	75—100	rise
	80	16/30	0/14		
	90	20/20	—		
Isopropylarterenol (Isuprel, Winthrop-Stearns)	200	0/20	11/20	50—200	fall
	400	0/10	4/10		
	500	8/37	20/29		
	600	5/10	4/5		
N,N-Dibenzyl-β-chlorethylamine (Dibenamine; Smith, Kline & French)	200	0/10	2/10	60—150	fall
	250	0/10	3/10		
	275	0/20	1/20		
	300	5/28	11/23		
Phenoxybenzamine (Dibenzyline; Smith, Kline & French)	10—50	0/43	0/43	40	fall
	75	0/10	0/10		
	100	1/10	0/9		
2-Benzyl-2-imidazoline (Priscoline, Ciba)	60	0/10	0/10	10—60	fall
	80	0/10	0/10		
	100	4/10	0/6		
Phentolamine (Regitine, Ciba)	100	0/5	0/5	50	fall
	125	0/10	0/10		
	150	8/10	0/2		
Piperoxan (Benodaine, Merck)	125	0/10	0/10	125	fall
	200	5/10	0/5		
Dihydro-ergotamine (Sandoz)	20	0/9	0/9	20	fall

* Number of mice dead / number of mice injected.
** Number of mice with induced tumor damage / number of surviving mice.

Table 1 (Continued)

Drug	Effect on mice bearing S-37			Effect on blood pressure	
	Dose (μg./g.)	Mortality*	Induced Tumor Damage**	Dose (μg./g.)	Effect
Ergonovine (Burroughs Wellcome)	10	0/10	0/10	8—12	rise
Bethanechol (Urocholine, Sharp & Dohme)	10, 20 40, 50	0/21 0/20	0/21 0/20	25—50	fall
Atropine	50 100	0/10 0/10	0/10 0/10	50	nil
Propantheline (Probanthin, Searle)	40	2/10	0/8	40—75	nil, or slight rise
Oxyphenonium (Antrenyl, Ciba)	30	1/10	0/9	20—40	very slight rise
Tetra-ethyl-ammonium (Etamon; Parke, Davis)	30 50 60	0/10 0/10 20/20	0/10 0/10 —	50	slight rise, followed by slight fall
Hexamethonium (Hexameton, Burroughs Wellcome)	20 40	0/10 8/10	0/10 0/2	20	slight rise, followed by slight fall
Trimethaphan Camphor Sulfonate (Arfonad, Roche)	60 80	0/10 4/9	0/10 0/5	50—80	fall
Vasopressin (Pitressin; Parke, Davis)	0.5 unit/g.	2/62	35/60	0.5 unit/g.	rise
5-Hydroxytryptamine (Serotonin, Upjohn)	50 75 100	0/39 0/26 0/8	26/39 25/26 8/8	100	rise
Hydralazine (Apresoline, Ciba)	50 100 125	0/10 5/10 6/9	0/10 0/5 3/3	50	slight rise, followed by fall
Phenobarbital Sodium (Merck)	100 200	0/7 1/19	0/7 0/18	200	slight rise, followed by fall
Pentobarbital Sodium (Nembutal, Abbott)	80 125 140 150	0/9 2/18 4/8 10/10	0/9 0/16 0/4 —	10	fall
Sodium Ethyl-isopropyl Barbiturate (Ipral Sodium, Squibb)	125 150	0/9 1/18	0/9 0/17	125	slight fall

* Number of mice dead / number of mice injected.

** Number of mice with induced tumor damage / number of surviving mice.

Table 1 (Continued)

Drug	Effect on mice bearing S-37			Effect on blood pressure	
	Dose (μg./g.)	Mortality*	Induced Tumor Damage**	Dose (μg./g.)	Effect
Urethan (Eastman Kodak)	1400 1600 1800	0/10 0/19 14/20	0/10 0/19 0/6	1500	fall
Chlorpromazine (Thorazine; Smith, Kline & French)	100—175 200	0/30 2/9	0/30 0/7	10	fall
Chloral hydrate	300 500	0/10 1/9	0/10 0/8	400	slight rise, followed by fall
Morphine	250 300 400	0/10 4/6 10/10	0/10 0/2 —	300	slight fall
Reserpine (Serpasil, Ciba)	25 50	0/8 0/8	0/8 0/8	25—50	fall
Alkavervir (Veriloid, Riker)	0.1—0.5 1 1.5 2	0/30 0/10 0/8 9/10	0/30 0/10 0/8 0/1	5	slight gradual fall
Histamine (base) (Nutritional Biochemical)	360 600 720	0/8 0/18 7/53	7/8 13/18 38/46	720	rise, followed by slight or no fall
48/80 (Burroughs Wellcome)	1 4 7 10	0/10 1/10 4/5 10/10	0/10 0/10 0/1 —	5	slight rise
Russel viper venom	2—2.5 4 5 10	1/18 6/10 8/18 9/10	4/17 2/4 8/10 0/1	10	delayed gradual fall
Tripelennamine (Pyribenzamine, Ciba)	20—50 55 60	0/30 0/10 7/7	0/30 0/10 —	50	slight rise
Phenindamine (Thephorin, Roche)	75—80 100	0/20 3/10	0/20 0/7	80	fall

* Number of mice dead / number of mice injected.
** Number of mice with induced tumor damage / number of surviving mice.

not materially alter the nature of the blood pressure changes; the overall effect given in the last column was the same for normal mice and for those bearing tumors.

Of the 37 drugs examined, tumor damage was induced with ten. Four of them (isopropylarterenol, vasopressin, 5-hydroxytryptamine and histamine) induced damage in tumors of at least half of the mice, with little or no accompanying lethality. Four others (epinephrine, amphetamine, hydralazine and viper venom) affected the tumors only at dose levels which killed a considerable proportion of the mice. Levarterenol and dibenamine were apparently intermediate with respect to tumor-damaging activity and lethality.

Discussion

It is not yet possible to paint a satisfactory picture of the mechanisms by which such tumor-necrotizing agents produce their effects in tumor tissue.

In a previous communication (Pradhan, Achinstein and Shear[14]) we reported a study in which a number of drugs were examined for ability to block the action of several such agents. Since the activity was reduced only of those tumor-necrotizing agents which were vasoconstrictors, and since the strongest inhibitors were vasodilators, vasoconstriction appeared to play a significant role in those actions.

Some of the findings in the present communication are consistant with this view. For example, the three drugs that exhibited the greatest effect on tumors with accompanying low lethal toxicity (viz., vasopressin, 5-hydroxytryptamine and histamine) all produced vasoconstriction in mice with resulting rise in blood pressure. Two other tumor-damaging drugs (levarterenol and amphetamine) are also vasoconstrictors.

On the other hand, another group of drugs with tumor-damaging activity (viz., isopropylarterenol, dibenamine and hydralazine) are vasodilators; their action on tumors cannot be accounted for on the basis of the foregoing hypothesis. While vasoconstriction appears to play a significant role in some of the phenomena involved in the production, or blocking, of hemorrhagic necrosis in tumors, other observations are not explicable on this basis.

The postulated role of persistent hypotension as the primary effect of tumor-necrotizing drugs in a chain of reactions leading to necrosis of tumor tissue has not been supported by the data reported here. After a method for the continuous recording of systemic blood pressure in mice was developed, and more drugs with this type of tumor-damaging activity were found, it became possible to investigate the relationship between changes in carotid blood pressure, following administration of these drugs to mice, and their effect on inducing damage in tumors. These two effects of the drugs were found to be independent of each other.

Of the ten drugs that induced damage in the tumors, five caused a *rise* in carotid blood pressure (viz., epinephrine, levarterenol, amphetamine, vasopressin and 5-hydroxytryptamine). Three others (isopropylarterenol, dibenamine and viper venom) caused a *fall*. Of the two

remaining active drugs, hydralazine produced a slight, temporary, rise followed by a fall, while histamine caused a rise followed by little or no fall. On the other hand, the drugs which lowered the blood pressure (e.g., priscoline, pentobarbital and phenindamine) constituted more than 60% of those without tumor-damaging activity. Thus, the nature of the change produced in systemic blood pressure with these drugs obviously did not parallel their tumor-damaging activity.

Summary

Thirty-seven drugs of various pharmacologic types were examined in CAF_1 mice for: a) capacity to induce hemorrhagic-necrosis in Sarcoma 37; and b) the changes induced in systemic blood pressure as continuously recorded with a technic devised for the direct measurement of carotid blood pressure in mice.

Of the ten tumor-damaging drugs, five caused a rise of carotid blood pressure, while three others caused a fall. More than 60% of the drugs which did not damage the tumors produced a lowering of systemic blood pressure.

Induction of tumor-damage with these drugs was found to be independent of the changes they produced in carotid blood pressure.

References

[1] Algire, G. E., and F. Y. Legallais: Vascular reactions of normal and malignant tissues *in vivo*. IV. The effect of peripheral hypotension on transplanted tumors. J. Nat. Cancer. Inst. **12**, 399 (1951). — [2] Algire, G. E., F. Y. Legallais and B. F. Anderson: Vascular reactions of normal and malignant tissues *in vivo*. V. The role of hypotension in the action of a bacterial polysaccharide on tumors. J. Nat. Cancer. Inst. **12**, 1279 (1952). — [3] Algire, G. E., F. Y. Legallais and B. F. Anderson: Vascular reactions of normal and malignant tissues *in vivo*. VI. The role of hypotension in the action of components of podophyllin on transplanted sarcomas. J. Nat. Cancer. Inst. **14**, 879 (1954). — [4] Algire, G. E., F. Y. Legallais and H. D. Park: Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. II. The vascular reactions of normal and neoplastic tissues of mice to a bacterial polysaccharide from Serratia marcescens (Bacillus prodigiosus) culture filtrates. J. Nat. Cancer. Inst. **8**, 53 (1947). — [5] Barrett, M. K.: Anaphylaxis and hemorrhage in transplanted tumors. J. Nat. Cancer. Inst. **2**, 625 (1942). — [6] Belkin, M., and D. B. Fitzgerald: Tumor-damaging capacity of plant materials. V. Miscellaneous plants. J. Nat. Cancer Inst. **14**, 607 (1953). — [7] Greenspan, E. M., J. Leiter and M. J. Shear: Effect of alpha-peltatin, beta-peltatin, and podophyllotoxin on lymphomas and other transplanted tumors. J. Nat. Cancer Inst. **10**, 1295 (1950). — [8] Leiter, J., V. Downing, J. L. Hartwell and M. J. Shear: Damage induced in Sarcoma 37 with podophyllin, podophyllotoxin, alpha-peltatin, beta-peltatin, and quercetin. J. Nat. Cancer Inst. **10**, 1273 (1950). — [9] Leiter, J., J. L. Hartwell, I. Kline and M. J. Shear: Damage induced in Sarcoma 37 with chemical agents. VII. Diphenylpropylamines, diphenylpropylenediamines, diphenylalkanes, and related compounds. J. Nat. Cancer Inst. **14**, 645 (1953). — [10] Leiter, J., J. L. Hartwell, G. E. Ullyot and M. J. Shear: Damage induced in Sarcoma 37 with chemical agents. V. Derivatives of colchicine and isocolchicine. J. Nat. Cancer Inst.

13, 1201 (1953). — [11] Pradhan, S. N., B. Achinstein and M. J. Shear: Action of drugs of different pharmacological nature on the carotid blood pressure of the mouse. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **113**, 44 (1955). — [12] Pradhan, S. N., B. Achinstein and M. J. Shear: Relation of the tumor-necrotizing effect of drugs to action on arterial blood pressure in mice. Federat. Proc. **14**, 380 (1955). — [13] Pradhan, S. N., B. Achinstein and M. J. Shear: Carotid blood pressure in normal and tumor-bearing mice. Amer. J. Physiol. **184**, 599 (1956). — [14] Pradhan, S. N., B. Achinstein and M. J. Shear: Effect of various drugs on the tumor-necrotizing activities of several chemical agents in mice. Cancer Res. **16**, 1062 (1956). — [15] Schrecker, A. W., G. Y. Greenberg and J. L. Hartwell: Components of podophyllin. XVI. Podophyllotoxin haloacetates and quaternary derivatives. J. Amer. Chem. Soc. **76**, 1184 (1954). — [16] Shear, M. J.: In Polysaccharides in Biology. Transactions of the First Conference, pp. 124—143, New York: The Josiah Macy, Jr. Foundation. 1956. — [17] Shear, M. J., and A. Perrault: Chemical treatment of tumors. IX. Reactions of mice with primary subcutaneous tumors to injection of a hemorrhage-producing bacterial polysaccharide. J. Nat. Cancer Inst. **4**, 461 (1944). — [18] Waravdekar, V. S., O. Powers and J. Leiter: Enzyme changes induced in normal and malignant tissues with chemical agents. VI. Effect of acetylpodophyllotoxin-ω-pyridinium chloride on malic-oxidase and on isocitric-oxidase systems of Sarcoma 37. J. Nat. Cancer Inst. **16**, 1443 (1956).

Dr. Murray J. Shear, Chief Laboratory of Chemical Pharmacoloy,
National Cancer Institute, Bldg. 10 Rm.4B—17, Bethesda 14, Md., USA

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 236—244 (1957)

Aus dem wissenschaftlichen Laboratorium der Chirurgischen Klinik
der Universität München

Über ein blutdrucksteigerndes Prinzip in Extrakten aus der Glandula submaxillaris der weißen Maus*

Von
E. Werle, R. Vogel und L. F. Göldel

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. Dezember 1956)

Bei einer Untersuchung über das Vorkommen von Inaktivatoren des Kallikreins in Speicheldrüsen von Säugetieren fiel uns die außerordentlich starke Blutdruckwirkung auf, welche Extrakte aus der Glandula submaxillaris der weißen Maus bei intravenöser Injektion am Hund auslösten.

Bereitung der Extrakte. Weiße Mäuse werden durch Ätherinhalation getötet. Die Submaxillarisdrüsen werden entnommen, mit Seesand fein zerrieben und mit der 20fachen Gewichtsmenge Wasser etwa 20 min lang extrahiert. Von Ungelöstem wird scharf abzentrifugiert. Werden im folgenden Extrakte höherer Verdünnungen angegeben, so sind sie stets als weitere Verdünnungen des Extraktes 1 : 20 aufzufassen.

Die Blutdruckwirkung von Submaxillaris-Extrakten der weißen Maus (WMS-Extrakte) und ihre Abgrenzung gegen die Wirkung von Submaxillaris-Extrakten anderer Tiere

Die intravenöse Injektion von 0,01 ml WMS-Extrakt, entsprechend 0,5 mg frischer Drüse, verursacht z. B. bei einem 20 kg schweren *Hund*, der in Pernocton-Narkose über die Art. carotis an ein Ludwigsches Quecksilbermanometer angeschlossen ist, eine Blutdrucksteigerung von etwa 20—30 mm Hg. Der Blutdruck bleibt auf der erreichten Höhe sehr lange (etwa 30—60 min) fixiert. Wird eine größere Menge Extrakt, z. B. 0,05 ml, entsprechend 2,5 mg frischer Drüse, intravenös injiziert, so erfolgt nach einer initialen kurzdauernden Blutdruck*senkung* von etwa 30 mm Hg eine Blutdruck*steigerung* um etwa 80 mm Hg über den Ausgangswert, die von einer Pulsbeschleunigung und gelegentlich, möglicherweise in Abhängigkeit von der Narkosetiefe, von einer vorübergehenden Pulsirregularität begleitet ist; diese Pulsirregularität tritt selten auch schon nach mittleren Dosen auf. Der Blutdruck bleibt wiederum auffallend lange auf der erreichten Höhe. Die Wiederholung

* Herrn Prof. Rolf Meier zu seinem 60. Geburtstage gewidmet.

der Injektion einer so „großen" Extraktmenge erhöht den Blutdruck nicht weiter, sondern bewirkt nur noch eine kurzdauernde Blutdrucksenkung, der vorgenannten initialen entsprechend, und ist ohne merklichen Einfluß auf die Herzaktion. Wiederholte Injektionen von kleineren Extraktmengen werden mit immer kleiner werdenden Blutdruckerhöhungen beantwortet, bis zur völligen Aufhebung der Ansprechbarkeit. Nach einem Intervall von mindestens 3 Std kann sich eine geringgradige Ansprechbarkeit für die Substanz wieder einstellen. Ein ausgiebiger Blutaustausch mit etwa der eineinhalbfachen Menge Hunde-Citratblut (bezogen auf die errechnete Blutmenge des Versuchstieres)

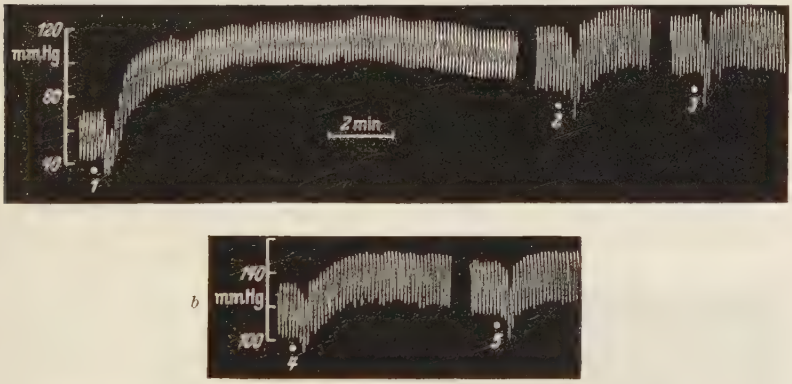


Abb. 1. *Wirkung von WMS-Extrakt am Blutdruck des Hundes.* Tachyphylaxie und Wiederansprechbarkeit nach Blutaustausch. Hund weiblich 7 kg. Morphium-Pernocton-Narkose, Ludwigsches Quecksilber-Manometer, Carotis-Druck. a) I.v. Injektion: *1:* 0,3 ml, *2* und *3:* je 0,2 ml WMS-Extrakt 1 : 200. b) Zwischen a) und b) Blutaustauschtransfusion mit 900 ml Hundeblut (Citratblut) *4* und *5:* je 0,3 ml WMS-Extrakt 1 : 200

führte bei einem Hund zu einer deutlich besseren Wiederansprechbarkeit; die ursprüngliche Empfindlichkeit wurde jedoch nicht entfernt wieder erreicht (Abb. 1).

An der mit Urethan narkotisierten *Ratte* verursacht die intravenöse Injektion von WMS-Extrakten ebenfalls eine Blutdrucksteigerung, die 10 min und länger anhält. Auch hier können bei höherer Dosierung Pulsveränderungen auftreten. Eine große Dosis hebt die weitere Ansprechbarkeit der Ratte auf, wiederholte kleinere Dosen führen zur schrittweisen Abnahme der Ansprechbarkeit des Tieres; nach einer Gesamtdosis von etwa 0,2—0,3 ml Extrakt 1 : 1000 ist die Ansprechbarkeit bei einem etwa 250 g schweren Tier gewöhnlich erschöpft. Nachfolgende wesentlich höhere Gaben (0,1 ml Extrakt 1 : 40) bewirken nur noch eine rasch vorübergehende Blutdrucksenkung, welche als kallikreinbedingt[2] aufgefaßt werden kann. Auch eine große Blutaustausch-Transfusion mit etwa der vierfachen Menge an Ratten-Citratblut

(bezogen auf die errechnete Gesamtblutmenge des Versuchstieres) erbrachte nur eine geringe Wiederansprechbarkeit auf WMS-Extrakt (Abb. 2).

Auch die *weiße Maus* selbst reagiert auf die intravenöse Injektion von Extrakten aus ihrer Submaxillaris in Dosen von z. B. 0,05 ml

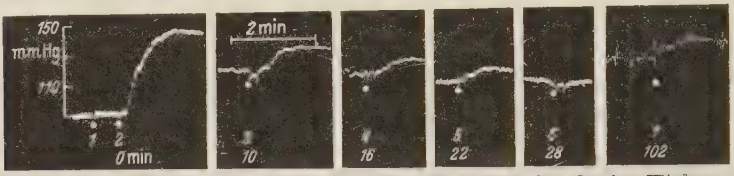


Abb. 2. *Wirkung von WMS-Extrakt am Blutdruck der Ratte. Tachyphylaxie und geringe Wiederansprechbarkeit nach Blutaustausch.* Ratte männlich 200 g. Urethan-Narkose, Quecksilbermanometer, Carotisblutdruck. I.v. Injektionen: *1:* 0,05 ml physiol. NaCl-Lösung, *2* mit *6:* je 0,05 ml WMS-Extrakt 1 : 1000. Zwischen *6* und *7* Blutaustauschtransfusion mit etwa vierfacher Blutmenge, bei *7:* 0,4 ml WMS-Extrakt 1 : 1000

Extrakt 1 : 200, wie Hund und Ratte mit einer langanhaltenden Blutdrucksteigerung nach einer initialen Blutdrucksenkung (Abb. 3).

Nach orientierenden Versuchen scheidet die Maus die blutdrucksteigernde Substanz in den Speichel aus: Intravenöse Injektion von Mäusespeichel, der nach Pilocarpin-Injektion gewonnen worden war, verursacht bei der Ratte und beim Hund eine Blutdrucksteigerung, die der nach WMS-Extrakt beobachteten vollkommen entspricht (Abb. 4)*.

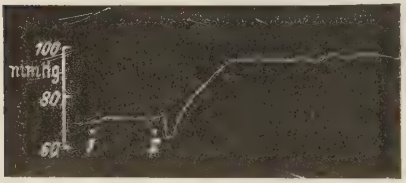


Abb. 3. *Wirkung von WMS-Extrakt am Blutdruck der weißen Maus.* Weiße Maus männlich 17 g. Urethan-Narkose, Quecksilber-Manometer, Carotisblutdruck. I.v. Injektionen: *1:* 0,05 ml physiol. NaCl, *2:* 0,05 ml WMS-Extrakt 1 : 200

Eine blutdrucksteigernde Wirkung, wie sie der WMS-Extrakt verursacht, konnte mit Ausnahme der Hausmaus bisher bei Submaxillaris-Extrakten keiner anderen Tierart festgestellt werden. Untersucht wurden Wald- und Feldmaus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Schwein, Hund, Katze, Rind, Schaf, Ziege, Hirsch, Reh und Gemse. Extrakte aus Submaxillaris, Sublingualis und Parotis der genannten Tiere wirkten mehr oder weniger stark blutdrucksenkend, was z. T. auf das bekannte Vorkommen von Kallikrein in Speicheldrüsen[2] zurückzuführen ist. Extrakte aus der Submaxillaris von Hund, Schwein, Rind und Pferd können zwar auch Blutdrucksteigerungen auslösen, doch sind diese gering und rasch vorübergehend. Die blutdrucksteigernden Substanzen der Extrakte aus den genannten Drüsen sind im Gegensatz

* *Anmerkung bei der Korrektur:* Nach unseren orientierenden Versuchen sprechen auch Katzen und Kaninchen auf die WMS-Extrakte mit langanhaltender Blutdrucksteigerung an.

zum WMS-Wirkstoff durch Serum inaktivierbar. Eine starke, länger anhaltende Blutdrucksteigerung mit initialer Blutdrucksenkung verursacht nach Ellis u. Krayer[1] an der Katze die Injektion von Extrakt aus der Submaxillaris der amerikanischen Spitzmaus, Blarina brevicauda, in die Art. coeliaca als Folge einer direkten Einwirkung auf das Nebennierenmark, während die intravenöse Injektion bei Katze und Kaninchen eine starke, länger anhaltende Blutdrucksenkung auslöst, an die sich bei Kaninchen gelegentlich, bei Katzen öfter, ein Anstieg des Blutdruckes bis deutlich über den Ausgangswert anschließt. Am Darm- und Uterusmuskel verursacht der Extrakt langsame, schwer auswaschbare Kontraktionen.

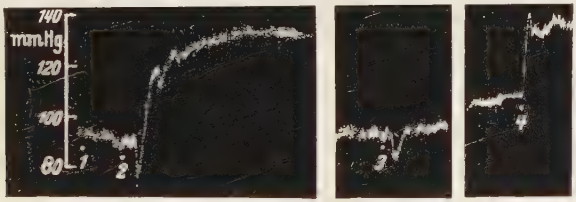


Abb. 4. *Wirkung des Speichels der weißen Maus am Blutdruck der Ratte.* Ratte männlich 200 g. Vorbemerkung wie bei Abb. 2. i.v. Injektionen: *1:* 0,1 ml physiol. NaCl, *2* und *3:* je 0,1 ml Mäusespeichel (1 : 2 mit Aqua dest. verdünnt), *4:* 2 γ Arterenol

Am Blutdruck des Hundes waren selbst 0,43 mg des aus der Gl. submaxillaris von Blarina brevicauda angereicherten Toxins unwirksam. Auch das chemische Verhalten der Wirksubstanzen aus der Submaxillaris von Blarina brevicauda und aus der Submaxillaris der weißen Maus ist verschieden. So wird das Toxin von Blarina brevicauda durch kurzes Aufkochen nicht zerstört.

Mit Ausnahme der Hausmaus-Submaxillarisextrakte können demnach die oben angeführten Drüsenextrakte das blutdruckaktive Prinzip des WMS-Extraktes nicht enthalten.

Andere pharmakologische Wirkungen der WMS-Extrakte und Abgrenzung gegen ähnlich wirkende Substanzen

Am isolierten Kaninchen-Aorten-Präparat nach Furchgott[3] verursacht der WMS-Extrakt eine verzögert einsetzende und langsam sich verstärkende Kontraktion, die sehr lange anhält, sehr schwer auswaschbar ist und durch Natriumazid nur wenig beeinflußbar ist (Abb. 5). Am isolierten Meerschweinchendarm verursacht der Submaxillarisextrakt eine langsam einsetzende, lang anhaltende und schwer auswaschbare Kontraktion. Wird der Extrakt mit Blutserum (z. B. vom Rind) vermischt und etwa 1 min später in die Suspensionsflüssigkeit eines isolierten Meerschweinchendarmes gegeben, so erfolgt eine rasche, sehr starke Kontraktion. Nach einigem Stehen des Ansatzes ist die neu

entstandene, darmaktive Substanz verschwunden, die ursprünglich vorhandene jedoch noch unverändert nachweisbar (Abb. 6). Diese Freilegung einer darmaktiven Substanz durch den WMS-Extrakt dürfte durch Kallikrein verursacht sein, das, wie erwähnt, in den Speicheldrüsenextrakten

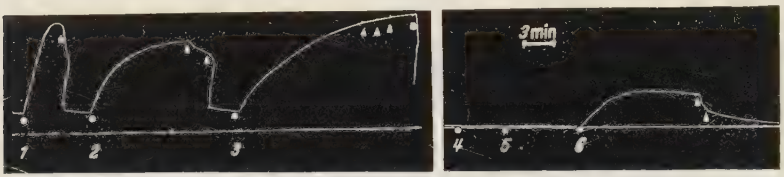


Abb. 5. *Wirkung von WMS-Extrakt an der isolierten Aorta des Kaninchens.* Kaninchenaortenpräparat 25 mm lang nach Furchgott. Badtemperatur 32° C, Badvolumen 10 ml, Hebelübertragung 1 : 5, luftdurchperlte Tyrodelösung. *1:* 3 γ Adrenalin, △: Spülen; 2 γ Azid, *2:* 2 γ Serotonin, △: Spülen; 2 γ Azid, *3:* 0,2 ml WMS-Extrakt 1: 20, □: Erschlaffung mit 10 γ Azid in 60 min, *4:* 0,5 ml Hundeserum, *5:* 0,2 ml Reninpräparat, *6:* 0,5 ml Serum mit 0,2 ml Renin 45 min inkubiert

enthalten und zur Freilegung von Kallidin aus Blutserum befähigt ist. Demnach handelt es sich bei der beobachteten Substanz um Kallidin[2].

Am Kaninchen-Aorten-Präparat sind außerdem wirksam: Adrenalin, Noradrenalin, Serotonin, Tryptamin, Histamin, Acetylcholin und Submaxillariskallikrein. Adrenalin, Noradrenalin und Histamin kontrahieren die Aorta rasch, sie erschlafft dann spontan oder nach kurzem Auswaschen; ähnlich, aber sehr viel schwächer wirkt Acetylcholin. Serotonin, Tryptamin und Submaxillaris-Kallikrein lösen Kontraktionen aus, die zwar eine Ähnlichkeit mit der nach WMS-Gaben beobachteten haben, sie sind aber verhältnismäßig leicht auswaschbar. Die durch Adrenalin oder Noradrenalin kontrahierte Aorta erschlafft rasch nach Zufügen von Natriumazid.

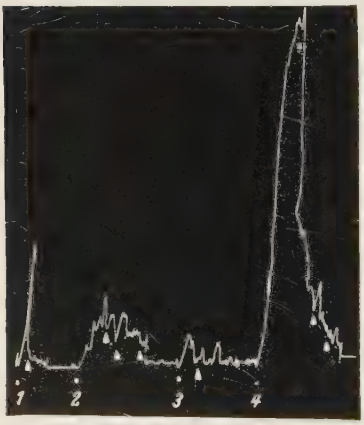


Abb. 6. *Wirkung von WMS-Extrakt am isolierten Meerschweinchendarm.* Badtemperatur 37° C, Badvolumen 10 ml, Hebelübertragung 1 : 5, luftdurchperlte Tyrodelösung mit Atropin. *1:* 0,2 γ Histamin, *2:* 0,1 ml WMS-Extrakt 1 : 200, *3:* 0,5 ml Serum, *4:* 0,5 ml Serum + 0,1 ml WMS-Extrakt, 5 min inkubiert bei 37° C, △ Spülen

Renin (aus Schweineniere*) ist an der isolierten Kaninchenaorta unwirksam. Durch Hypertensin aber wird diese kontrahiert. Inkubiert man nämlich Serum (z. B. vom Hund) bei 37 °C 45 min lang mit Renin, so bewirkt dieser Ansatz eine anhaltende,

* Das bei unseren Versuchen verwendete Renin wurde nach E. Haas (Methods in Enzymology, Bd. II, S. 125, New York 1955) aus Schweinenieren gewonnen.

aber leicht auswaschbare Kontraktion der isolierten Aorta (s. Abb. 5). Die intravenöse Injektion von WMS-Extrakt-Mengen, die beim Hund eine gut meßbare Blutdrucksteigerung hervorruft, wirkt bei weißen Mäusen und Ratten nicht toxisch.

Chemische und physikalische Eigenschaften des blutdrucksteigernden Prinzips der WMS-Extrakte

Die blutdrucksteigernde Wirkung der Extrakte hält sich bei —10° bis —15° C tagelang praktisch unverändert; bei Zimmertemperatur nimmt sie im Verlauf von einigen Tagen sehr merklich ab und verschwindet innerhalb von 2 Wochen praktisch vollkommen. Werden die Extrakte 2 min über freier Flamme gekocht oder einige Stunden bei Zimmertemperatur bei p_H 2 oder 8 belassen oder mit Aceton und Äther getrocknet, so verlieren sie ihre blutdrucksteigernde Wirkung. Bei 24stündiger Dialyse gegen stehendes Wasser durchdringt die blutdrucksteigernde Substanz die Zellophanmembran auch nicht spurenweise. Sie ist also hochmolekular. Durch Halbsättigung ihrer Lösungen mit Ammonsulfat oder durch Versetzen mit dem 2—3fachen Volumen Alkohol wird sie quantitativ gefällt. Es handelt sich also wahrscheinlich um einen Eiweißkörper*. In vitro wird das blutdrucksteigernde Agens der WMS-Extrakte durch Serum nicht merklich inaktiviert.

Die das Kaninchen-Aorten-Präparat kontrahierende Substanz der WMS-Extrakte ist bisher physikalisch und chemisch von der blutdruckwirksamen nicht unterscheidbar. Bei dem blutdrucksteigernden und dem aortenkontrahierenden Prinzip der WMS-Extrakte dürfte es sich daher um ein und dieselbe Substanz handeln: Der verzögert einsetzenden und sich langsam entwickelnden, lang unvermindert anhaltenden Blutdrucksteigerung entspricht die verzögert eintretende, langsam sich steigernde und lang unvermindert anhaltende Verkürzung des Aortenpräparates.

Zur Frage des Wirkungsmechanismus des blutdrucksteigernden Prinzips der Glandula submaxillaris der weißen Maus

Die Frage, ob das blutdrucksteigernde Prinzip der WMS-Extrakte eine selbständige Wirkung besitzt oder ob es als Ferment über die Freisetzung einer aktiven Substanz aus einer inaktiven Vorstufe des Serums wirkt, ähnlich wie Renin, kann auf Grund unserer Versuche noch nicht mit Sicherheit entschieden werden. Zwar spricht die Wirkung an der isolierten Aorta für die erste Alternative, doch ist die Identität des an

* *Anmerkung bei der Korrektur.* Bei fraktionierter Ammonsulfatfällung der WMS-Extrakte werden die blutdrucksteigernde und -senkende Substanz voneinander und von Ballast-Eiweiß getrennt. Dasselbe gelingt auch durch horizontale Elektrophorese.

Aorta und Blutdruck wirksamen Prinzips noch nicht absolut gesichert. Die nach Injektion einer größeren WMS-Extrakt-Menge eintretende Tachyphylaxie könnte demnach auf einer Blockierung von Receptoren oder, ähnlich wie die Renin-„Tachyphylaxie" auch auf einer Erschöpfung der inaktiven Vorstufe des Blutserums beruhen. Unsere bisherigen Versuche sprechen gegen die letztere Möglichkeit. Inkubation des WMS-Extraktes mit Serum bewirkte nämlich weder eine merkliche Verstärkung noch ein beschleunigtes Einsetzen der Blutdruckwirkung.

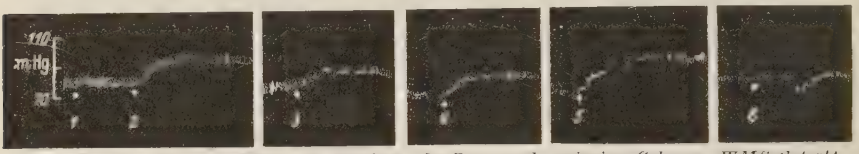


Abb. 7. *Unwirksamkeit von Renin am Blutdruck der Ratte nach vorheriger Gabe von WMS-Extrakt.* Ratte weiblich 300 g. Vorbemerkung wie bei Abb. 2. I.v. Injektionen: *1:* 0,2 ml physiol. NaCl, *2*, *3*, *4* und *6:* je 0,1 ml Schweinenieren-Renin-Lösung, *5:* 0,05 ml WMS-Extrakt 1 : 1000

Kleinere Blutaustauschtransfusionen, z. B. bis zu 50% des Blutvolumens stellten die Ansprechbarkeit von Hund und Ratte für WMS-Extrakte nicht wieder her; sehr ausgiebige Austauschtransfusionen (bis zum 1,5fachen der kreisenden Blutmenge beim Hund und dem 4fachen bei der Ratte) nur zu einem sehr geringen Teil. Dies dürfte eher eine Folge der Auswaschung von Wirksubstanz sein, welche die Receptoren blockiert hatte, als einer Ergänzung inaktiver Vorstufe (s. Abb. 1 und 2).

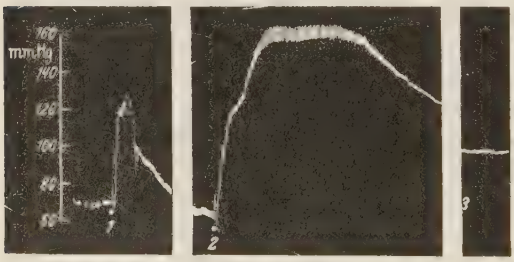


Abb. 8. *Wirkung von WMS-Extrakt am Blutdruck der nephrektomierten Ratte.* Ratte männlich 200 g. Vorbemerkung wie bei Abb. 2. 1 Std nach beidseitiger Nephrektomie i.v. Injektionen: *1:* 2 γ Arterenol, *2:* 0,2 ml WMS-Extrakt 1 : 1000, *3:* Blutdruckhöhe 24 min nach Injektion 2

Interessanterweise bezieht sich die Tachyphylaxie nach WMS-Extrakt auch auf Renin, während die Ansprechbarkeit für Noradrenalin oder Vasopressin erhalten bleibt.

Eine Tachyphylaxie gegen Renin ist an Hund und Ratte sehr viel schwerer zu erzielen als gegen WMS-Extrakt. Während beträchtliche Blutdrucksteigerungen durch wiederholte Renininjektion in kurzen Zeitabständen, (z. B. von 5—10 min) immer wieder zu erreichen sind, sprechen die Versuchstiere auf WMS-Extrakt bei gleichstarker erstmaliger Blutdruckerhöhung günstigstenfalls noch zwei- bis dreimal mit stark abnehmender Intensität an. Schon eine geringe Dosis WMS-Extrakt macht das Versuchstier unansprechbar für Renin, wobei eine vollständige Tachyphylaxie für WMS-Extrakt noch nicht eingetreten zu sein braucht

(Abb. 7). Eine Beteiligung des Renin-Hypertensin-Systems an der Blutdruckwirkung der WMS-Extrakte in dem Sinne, daß die Extrakte eine Mobilisierung von Renin aus der Niere bewirken, konnte ausgeschlossen werden, da die Ratte nach Exstirpation beider Nieren eher besser als schlechter auf WMS-Extrakte ansprach (Abb. 8).

Eine gewisse Ähnlichkeit mit der blutdrucksteigernden Substanz der WMS-Extrakte hat auch das „sustained-pressor-principle" der Niere von O. M. HELMER[1], das bei länger dauernder Hypotonie in der Niere

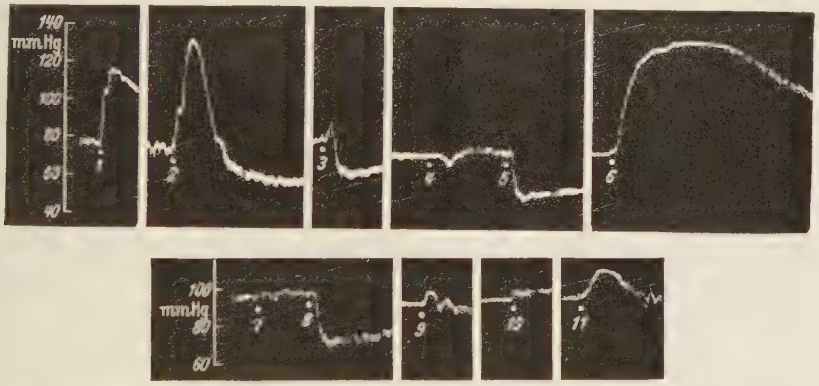


Abb. 9. *Wirkung von WMS-Extrakt am Blutdruck der Ratte nach Hydergin. Wirksamkeit von Vasopressin nach Tachyphylaxie für WMS-Extrakt.* Ratte männlich 210 g. Vorbemerkung wie bei Abb. 2. I.v. *Injektionen: 1, 4* und *7:* 1 γ Arterenol, *2, 5* und *8:* 1 γ Adrenalin, *3:* 100 γ Hydergin, *6:* 0,2 ml WMS-Extrakt 1 : 1000, *9:* 5 γ Arterenol, *10:* 0,2 ml WMS-Extrakt 1 : 1000, *11:* 1/1000 E Tonephin

gebildet wird und im Blutplasma erscheint. Eine Abgrenzung beider Stoffe gegeneinander wurde von uns noch nicht vorgenommen.

Die Blutdrucksteigerung nach WMS-Extrakt könnte auch durch Ausschüttung von Adrenalin oder Noradrenalin aus dem Nebennierenmark zustande kommen, wie etwa nach der Injektion von Submaxillaris-Extrakt aus Blarina brevicauda in die Art. coeliaca der Katze. Diese Möglichkeit ist jedoch auszuschließen auf Grund folgender Tatsachen: 1. Werden bei einer Ratte die Nebennieren exstirpiert, so bleibt eine Ansprechbarkeit für WMS-Extrakte erhalten. 2. Nach Aufhebung der Ansprechbarkeit der Ratte für Adrenalin und Arterenol durch Hydergin bleibt WMS-Extrakt wirksam (Abb. 9).

Auch an eine Ausschüttung von Vasopressin nach WMS Extrakt-Injektion wäre zu denken. Sie erscheint aber ausgeschlossen, weil in Pernocton-Narkose der Hund auf Vasopressin nur wenig anspricht. Eine Identität mit Vasopressin ist ausgeschlossen, weil dieses im Gegensatz zu WMS-Wirkstoff niedermolekular ist und weil ein gegen WMS-Extrakt tachyphylaktisches Tier auf Vasopressin noch anspricht (Abb. 8, Injektion 10 und 11).

Unsere Versuchsergebnisse machen es sehr wahrscheinlich, daß es sich bei dem blutdrucksteigernden Prinzip der Submaxillaris der weißen Maus um eine neue, selbständig wirksame Substanz handelt. Aus unseren Messungen geht hervor, daß sie eine hohe spezifische Aktivität (Aktivität/mg Substanz) besitzt; schon 1 γ/kg Tier verursacht eine sehr merkliche Blutdruckwirkung bei Hund und Ratte.

Zusammenfassung

Extrakte aus der Submaxillaris der weißen Maus verursachen nach i.v. Injektion bei Hund, Ratte und Maus eine sehr starke, lang anhaltende Blutdrucksteigerung. Wiederholte Injektionen führen rasch zur Tachyphylaxie. Bei dem wirksamen Prinzip dürfte es sich um eine bisher unbekannte Substanz von Eiweißcharakter und sehr hoher spezifischer Wirkung handeln.

Literatur

[1] Ellis, S., u. O. Krayer: J. Pharmacol. Exper. Ther. **114**, 127 (1955). — [2] Frey, E. K., H. Kraut und E. Werle: Kallikrein. Stuttgart 1950. — [3] Furchgott, R. F.: Pharmacol. Rev. **7**, 183 (1955). — [4] Helmer, O. M., in J. H. Gaddum: Polypeptides. Edinburgh 1955.

Prof. Dr. Dr. E. Werle,
Chirurgische Klinik der Universität München, Nußbaumstr. 20

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 245—256 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg/Br.
(Direktor: Professor Dr. S. Janssen)

Untersuchungen über die Temperaturverteilung in der Niere des Hundes* **

Von
S. Janssen und G. Grupp

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. November 1956)

Die Wärmebildung der Niere wurde von Janssen u. Rein (1927) aus der Temperaturdifferenz des arteriellen und venösen Blutes und der Größe der Durchblutung berechnet. Da Bedenken auftauchten, ob die Messung der Nierendurchblutung mit der Diathermie-Thermostromuhr (Rein u. Janssen, 1927) hinreichend sichere quantitative Aussagen zulasse, sind diese Versuche nicht weitergeführt worden. Diese Bedenken sind nicht verstummt. Sie führten zur Konstruktion neuer Elementtypen (Oberdorf u. Wilcke, 1954; Aschoff, Heinemann u. Wever, 1956), nachdem auch die theoretischen Grundlagen der Funktionsweise der Thermostromuhr unter neuen Gesichtspunkten überprüft worden waren (Aschoff u. Wever, 1956; Wever, 1956).

Bei der Wiederaufnahme der Versuche, zunächst noch mit der „unblutigen", dann mit der „blutigen" Thermostromuhr beobachteten wir, daß der Heizstrom des Diathermie-Thermo-Elementes nicht nur das Blutgefäß, sondern auch das umgebende Gewebe erwärmt. Dadurch war eine gleichzeitige Messung von Durchblutung und Bluttemperatur in Arterie und Vene nicht möglich. Janssen u. Rein suchten damals diesen Mißstand zu vermeiden und registrierten abwechselnd die Durchblutung der Nieren oder die Temperaturdifferenz zwischen Vene und Arterie. Es kommt aber auf die *gleichzeitige* Registrierung der beiden Größen an.

In den folgenden Versuchen haben wir die Methode der Messung der Durchblutung und der Temperaturdifferenz verbessert und zusätzlich die Temperaturen der Nierenrinde und des Nierenmarks bestimmt[1].

Zur Messung der Nierendurchblutung haben wir das Bubble-Flow-Meter (BFM) von Soskin (1934) benutzt, das wir für unsere Versuche

* Herrn Professor Dr. Rolf Meier zum 60. Geburtstag gewidmet.

** Mit Unterstützung der Freiburger Wissenschaftlichen Gesellschaft.

[1] Für die Entwicklung und den Bau der Apparaturen sind wir Herrn Dr. G. Baumgartner sowie Herrn Mechanikermeister S. Schleer zu großem Dank verpflichtet.

zu einer quantitativen Messung mit hinreichender Genauigkeit von $\pm 2\%$ eingerichtet haben (Baumgartner, Grupp u. Janssen, 1955). Der Nachteil dieser Methode, das Blut ungerinnbar zu machen, ist in unserem Falle ein Vorteil, weil wir jetzt die Temperatur *innerhalb* von Arterie und Vene und nicht mehr an der Gefäßwand messen können. Die Ausarbeitung dieses Verfahrens hat im allgemeinen die Resultate von Janssen u. Rein bestätigt. Im folgenden soll über die methodischen Voraussetzungen und über die Temperaturverteilung in der Niere berichtet werden.

Methodik

Die Versuche wurden an der linken Niere von Hunden mit einem Körpergewicht von 12—18 kg durchgeführt. Zur Narkose verwendeten wir meistens Chloralose (0,1/kg i.v.). Auf zusätzliche Gaben von Morphin (auch am Tage vor dem Versuch) verzichteten wir, weil dadurch eine stärkere Verminderung der Nierenausscheidung für mehr als 24 Std eintritt (Bonsmann, 1930). Nur zu Beginn unserer Versuche wurde auch Numal (Roche) in Dosen von 0,5 ml/kg der 10%igen Lösung zur Narkose benutzt. In eigenen Untersuchungen mit Neth (1955) und Walz (1955) ist dann festgestellt worden, daß die Nierenleistung im bezug auf Wasser-, Chlor- und Stickstoffausscheidung durch Chloralose nicht, durch Numal jedoch stark eingeschränkt wird. Zur Hemmung der Blutgerinnung wurde entweder Heparin (350 IE/kg) oder polyäthylensulfosaures Natrium (20 mg/kg)[1] gegeben. Beide Stoffe waren gut brauchbar, sie störten die normale Diurese nicht (K. Goerttler, unveröffentlicht). Die Nierengefäße wurden vom Bauch her freigelegt und die Wunde später wieder geschlossen. Bei einzelnen Fragestellungen, wie z. B. bei der Messung der Temperaturverteilung in der Niere, wurde die Niere vom Rücken her retroperitoneal freigelegt. Die Körpertemperatur wurde entweder mit einem Thermometer rectal oder mit einem Thermoelement im kleinen Becken gemessen. In den linken Ureter wurde nahe der Niere eine Kanüle eingeführt. Die Tropfenzahl des Harnes registrierten wir photoelektrisch.

Den Blutfluß durch die Niere bestimmten wir mit einem Bubble-Flow-Meter mit lichter Weite von 4,5 mm und einer Rohrlänge von 14 cm. Dazu war eine möglichst weite Kanüle in die linke Nierenvene eingebunden, aus der das Venenblut durch einen Polyäthylenschlauch zum BFM geleitet und von diesem durch eine lange Stahlkanüle (Durchmesser 3—5 mm) in die linke Femoralvene zurückgeführt wurde. Nahe der Niere zwischen der Venenkanüle und dem BFM konnte durch einen Nebenschluß der Venendruck fortlaufend photographisch registriert werden. Der Widerstand des BFM erhöhte den Venendruck der Niere bei schnellem Durchfluß um 3—5 cm Wasser. Der arterielle Druck wurde an der linken Femoralarterie gemessen und mittels einer Frankschen Kapsel fortlaufend registriert.

Folgende Temperaturdifferenzen wurden mit Thermoelementen aus Kupfer-Konstantan gemessen:

1. Die Differenz zwischen der Temperatur des arteriellen Blutes in der Aorta in unmittelbarar Nähe des Abflusses der linken Nierenarterie und einer konstanten Temperatur in einem Höppler-Thermostaten als Bezugssystem. Diese Differenz zeigte ein Spiegelgalvanometer von Siemens an (Widerstand 25 Ohm), 1 cm des Ausschlages entsprach etwa 0,12° C;

2. Die Temperaturdifferenz zwischen dem venösen und arteriellen Blut durch ein Zernicke-Galvanometer der Firma Kipp (Widerstand von 5—7 Ohm). 1 cm des Ausschlags entsprach etwa 0,05° C.

[1] Wir danken den Höchster Farbwerken für die Überlassung der Substanz.

3. Die Temperaturdifferenzen zwischen dem arteriellen Blut einerseits und je einer Stelle der Nierenrinde und des Nierenmarkes. Die beiden Elemente wurden ebenfalls über 2 ZERNICKE-Galvanometer von Kipp registriert. 1 cm Ausschlag entsprach etwa 0,05° C.

Die 4 Bezugslötstellen, die die Temperatur des Arterienblutes bestimmten, wurden in einem kleinen Kunststoffschlauch vereinigt, durch einen Ast der Aorta caudalis in die Aorta abdominalis eingeführt und bis zum Abgang der linken Nierenarterie (10—12 cm von der Aortenteilungsstelle) vorgeschoben. Die anderen Thermoleitungen waren zur Isolation gegen Feuchtigkeit und Temperaturschwankungen in Kunststoffschlauch eingelegt. Die ganze Versuchsanordnung ist in Abb. 1 dargestellt.

Nach den Beobachtungen von JANSSEN u. REIN ist die Temperaturdifferenz zwischen den arteriellen und venösen Gefäßen der Niere sehr gering. Daher waren

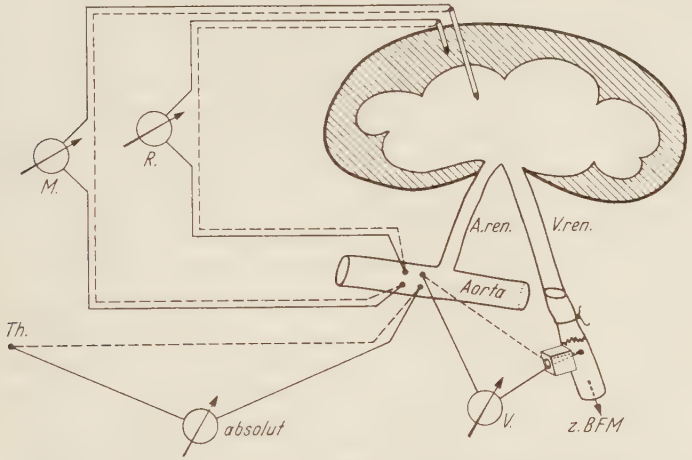


Abb. 1. Schema der Versuchsanordnung. Die Buchstaben an den Galvanometern bedeuten: bei *R* Registrierung der Temperaturdifferenz von Aorta zu Nierenrinde; *M* Differenz Aorta-Nierenmark; *V* Differenz Aorta—Nierenvene; *absolut* Differenz Aorta — Thermostat (Th.) als Bezugssystem. *Z.BFM* Blut wird aus der Nierenvene zum Bubble-Flow-Meter geleitet

besondere Maßnahmen zu treffen, um die Bluttemperatur richtig zu bestimmen. Durch die Nachbarschaft von Organen mit höherer Temperatur in der Nähe der Nierengefäße könnten Verfälschungen auftreten. Sie wurden durch die besondere Konstruktion der einzelnen Thermolötstellen der Elemente vermieden.

a) Die Thermolötstelle im absoluten Bezugssystem war mit einem dicken Paraffintropfen umgeben, der in ein mit Luft gefülltes Reagensglas hineinhing. Dieses Reagensglas war mit Watte verschlossen und lag im HÖPPLER-Thermostaten. Paraffin und Luftmantel dienten zur Dämpfung der geringen, durch die Schaltung bedingten Temperaturschwankungen des Thermostaten.

b) Alle Thermoelemente für das arterielle Blut waren in einem gemeinsamen „Thermokopf" vereint. Dieser arterielle „Thermokopf" wurde durch die Schwanzarterie in die Aorta bis in die Höhe des Abganges der linken Nierenarterie vorgeschoben. Um eine direkte Berührung der 4 Lötstellen mit der Aortenwand zu vermeiden, lag dieser „Kopf" in einem dünnen oben offenen Rohr aus Plexiglas von 2,0 mm äußerem Durchmesser und 6 mm Länge.

Dieses Rohr hatte seitliche Öffnungen. Das Blut konnte durch das oben offene Lumen eintreten, floß an den 4 Thermolötstellen vorbei und aus den seitlichen Öffnungen heraus (Abb. 2).

c) Das Venenblut wurde durch eine weite Kanüle von 4 mm Durchmesser aus Plexiglas zum BFM abgeleitet. In der Kanüle lag das Thermoelement für das Venenblut. Bei der Präparation der Vene waren gelegentlich Schlieren von hellerem Blut zu beobachten, aus deren Vorhandensein man schließen muß, daß möglicherweise auch Stromfäden verschiedener Temperatur in der Nierenvene vorkommen. Um einen Durchschnittswert der Temperatur des Blutes zu erhalten, hatte deshalb die Thermolötstelle in der Kanüle eine stabartige Form und war mit der Spitze gegen die Stromrichtung in einem Winkel von 45° C abgewinkelt.

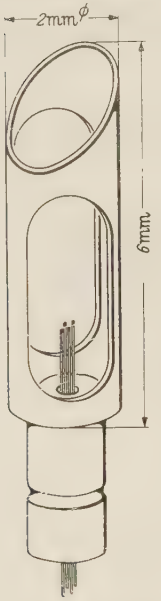


Abb. 2. Plexiglasmantel des „Thermokopfs"

d) Die Temperaturen im Nierenparenchym wurden in der Rinde im Abstand von 2,5—4 mm und im Mark im Abstand von 12—15 mm von der Oberfläche gemessen. Die unterschiedlichen Abstände resultieren aus den insgesamt 9 verwendeten Elementen, deren Nadellängen um den angegebenen Betrag differierten. Die Lötstellen und die zuführenden Drähte lagen isoliert in dünnen Injektionsnadeln. Die Nadeln waren scharf parallel an einem Plexiglasknopf fixiert. Sie wurden an der großen Kurvatur der Niere eingesteckt, der Plexiglasknopf saß dann fest auf der Nierenoberfläche. Nach jedem Versuch wurde die Lage der Nadelspitzen genau festgelegt, die ganze Niere herausgenommen und gewogen.

Die Höhe des arteriellen und venösen Blutdruckes, die Tropfenzahl des Harns und die verschiedenen Temperaturdifferenzen wurden auf einem Photokymographion registriert. Die Ausschläge des BFM wurden über einen Ordinatenschreiber auf ein Rußkymographion übertragen, dessen Signaleinrichtung mit der Photoregistrierung zeitlich gleichgeschaltet war.

Ergebnisse

1. Voruntersuchungen

Zunächst stellten wir uns die Frage, inwieweit unsere Versuchsanordnung die tatsächlichen thermischen Verhältnisse erfaßt. Nach den anatomischen Gegebenheiten waren alle Bezugslötstellen in der Aorta in der Nähe des Abgangs der Arteria renalis angebracht, so daß also die Temperatur des arteriellen Blutes etwa 5 cm vor der Niere gemessen wurde. Ebenso befand sich die Lötstelle zur Messung der venösen Bluttemperatur etwa 3 cm von dem Nierenhilus entfernt. Es war zu prüfen, ob in den Gefäßstrecken zur und von der Niere sich die Temperatur des Blutes verändere.

a) Konstanz der Bluttemperatur entlang der Aorta. Für die Messung der Konstanz der Temperatur entlang der Aorta wurden 2 Differenzelemente durch die Aorta caudalis des Hundes so eingeführt, daß die Lötstelle des ersten Elementes in der Höhe des Abganges der Nierenarterie

festlag. Dort verblieb sie während des ganzen Versuchs. Die Lötstelle des zweiten — mobilen — Elementes war bis zum Aortenbogen vorgeschoben. Die Vergleichslötstellen lagen im Thermostaten. Nach Einstellung der Temperaturkonstanz wurde die mobile Lötstelle jede Minute um 1 cm schwanzwärts bis zur Einbindungsstelle in der Schwanzarterie herabgezogen und somit die Temperatur längs der Aorta abgetastet und registriert. Außerdem wurde die Körpertemperatur im kleinen Becken zur Kontrolle fortlaufend gemessen.

Die Ausschläge des mobilen sowie des fixierten Thermoelementes verhielten sich identisch. Im Laufe des Versuchs hatte sich die Körpertemperatur um insgesamt 0,05° C geändert, dementsprechend veränderten sich auch die Temperaturen beider Thermoelemente, untereinander zeigten sie aber keine Abweichungen. In 5 Versuchen an verschiedenen Hunden fiel das Ergebnis prinzipiell gleich aus. Längs der Aorta zwischen Zwerchfell und Abgang der Art. iliacae ist demnach die Bluttemperatur im strömenten Blut konstant; damit erscheint die Annahme berechtigt, daß auch in dem kurzen Stück der Nierenarterie die Temperatur gleich bleibt. Es bestanden deshalb keine Bedenken, die arterielle Temperatur am Abgang der Nierenarterie zu messen. Temperaturänderungen über den Aortenquerschnitt hinweg lagen innerhalb der Fehlerbreite der Methode.

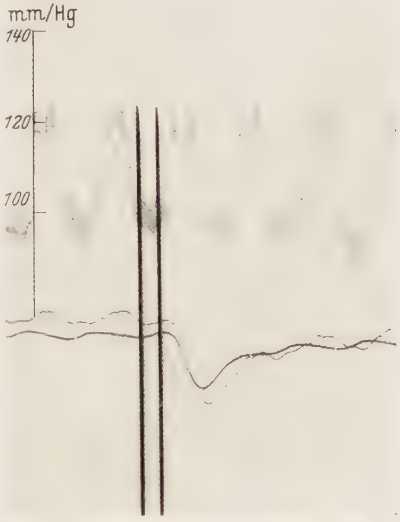


Abb. 3. Bewegung der Aortentemperatur auf i.v. Injektion kalter Lösung. Bei Doppelsignal: 3 ml physiologische Kochsalzlösung (26° C) i.v.; obere Registrierung: Blutdruck; mittlere: Temperatur Aortenblut, nahe Nierenarterie; untere: Aortenblut am Aortenbogen

Nach i.v. Injektion von physiologischer Kochsalzlösung (v. Femoralvene), die kühler als das Blut ist, treten vorübergehende Schwankungen der Temperatur im Aortenblut auf, wie sie in Abb. 3 wiedergegeben sind. Die Temperatur sinkt sowohl in der Höhe des Aortenbogens als auch am Eingang der Nierenarterie ab.

Die Injektion von Adrenalin (Abb. 4) steigert vorübergehend die Temperatur im Aortenblut. Vermutlich wird die Erwärmung durch die Ausschüttung des wärmeren Blutes aus der Leber (Grab, Janssen u. Rein, 1929) verursacht.

b) Konstanz der Temperatur längs der Nierenvene. Eine bewegliche Lötstelle wurde durch einen Seitenschluß der Venenkanüle in die Nierenvene

bis zum Verspüren eines Widerstandes — etwa 5 cm — vorgeschoben. Die Lötstelle befand sich damit sicher im Bereich der großen V. interlobares. Es ist möglich, daß bei diesem Vorgehen einige der zarten Klappen in den inneren Nierenvenen zerstört wurden (v. Kügelgen, 1956). Die Lötstelle wurde allmählich zurückgezogen und ihre Temperaturdifferenz zur Arterie fortlaufend registriert. Verglichen wurden

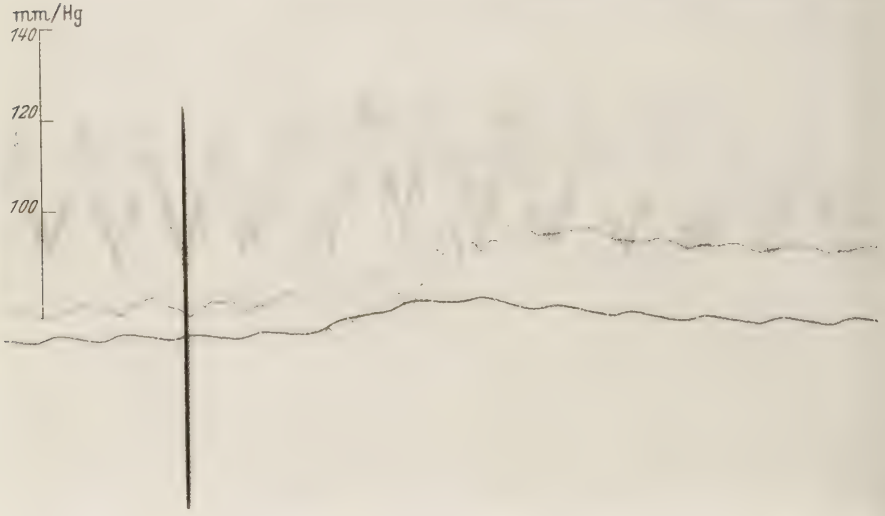


Abb. 4. Temperaturänderung im Aortenblut auf 1 γ/kg Adrenalin i.v. (0,2 ml Lösung 38° C warm). Bezeichnung der Kurven wie in Abb. 3

die Temperaturdifferenzen zwischen der festen Lötstelle in der Venenkanüle und der beweglichen Lötstelle in der Nierenvene. Beide Temperaturdifferenzen blieben in allen Versuchen völlig gleich. Die Temperatur des Venenblutes ändert sich also zwischen Nierenhilus und der Meßlötstelle in der Venenkanüle nicht.

c) Unterschied der Temperaturmessung in und am Gefäß. Im Verlauf unserer Untersuchungen haben wir mit 3 verschiedenen Versuchstypen gearbeitet: A) Temperaturmessung an den Gefäßwänden der Arterie und der Vene; B) an der Arterienwand und im strömenden Venenblut und C) im strömenden Blut der Aorta und der Nierenvene. Die verschiedenen Meßergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt.

Die Temperaturdifferenzen, die durch die Messung an den beiden Gefäßwänden (A) erhalten wurden, sind mit durchschnittlich 0,074° C am niedrigsten. Die Differenz Arterienwand : Venenblut (B) beträgt 0,086° C. Bei der direkten Messung im strömenden Blut beider Gefäße (C) ist die Temperaturdifferenz mit 0,109° C am höchsten. Für A) liegen Messungen an 14 Hunden zugrunde, für B) an 19 und für C) an

18 Hunden. Die im einzelnen Versuch gemessenen Temperaturdifferenzen können wegen der unterschiedlichen Durchblutung für einen Vergleich nicht herangezogen werden. Wenn aber in vielen Versuchen bei verschiedener Anlegung der Thermoelemente die Differenzen bei Messung im strömenden Blut am höchsten sind, so haben diese Werte die größte Wahrscheinlichkeit.

2. Temperaturverteilung in der Niere

Für die Messung der Temperaturverteilung in der Niere wurden Thermolötstellen langsam von der Nierenrinde bis zum Nierenbecken millimeterweise eingestochen und die Temperaturdifferenzen gegen die Nierenarterie registriert. Dazu war aus Plexiglas ein gabelförmiger Halter konstruiert.

Die Gabelarme waren der Rundung der Nierenoberfläche angepaßt. Zwischen den Gabelzinken lag Nierenbecken, Ureter und die Gefäße. Am Gabelstiel befand sich eine Führung mit Schraubgewinde, welche 2 oder 3 dünne Injektionsnadeln mit Thermolötstellen vorschieben konnte. (Diese Schraubeinrichtung gestattete, die Nadeln einzustechen und wieder herauszuziehen.)

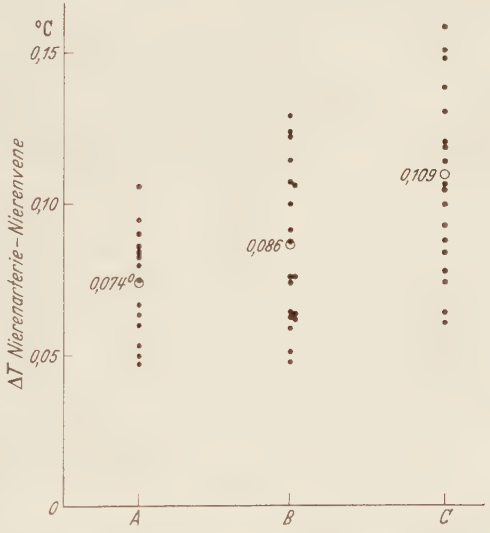


Abb. 5. Temperaturdifferenz Nierenarterie—Nierenvene bei unterschiedlicher Anlegung der Thermoelemente (siehe Text)

Die Bezugslötstellen lagen im arteriellen Blut. Mikroskopische Präparate der Stichstellen orientierten uns über den Grad der Verletzungen, die die Nadeln setzten. Sie waren in vielen Versuchen sehr gering.

In Abb. 6 sind die Temperaturdifferenzen der millimeterweise vorgeschobenen nadelförmigen Thermolötstellen gegen die Nierenarterie wiedergegeben.

Von außen nach innen wird die Temperaturdifferenz zunächst schnell größer und erreicht in 3 –4 mm Abstand von der Nierenoberfläche ihr Maximum. Dann fallen die Differenzen zu ihrem tiefsten Punkt, der der Gegend der großen Bogenarterien und Venen entspricht. Im Mark erfolgt allmählich ein zweiter Anstieg, ohne das Maximum in der Rinde zu erreichen. Diese Ergebnisse wurden an den linken Nieren von

10 Hunden gewonnen. In 4 Versuchen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Von besonderem Interesse war die Prüfung der Realität des Befundes, wonach die Temperaturdifferenz der Nierenrinde trotz sehr viel größerer Durchblutung höher war als die des Nierenmarkes. Wir haben dafür aus allen Nierenversuchen, bei denen nach der Versuchsanordnung (s. Abb. 1) die Temperaturdifferenz in Rinde und Mark in je einem Punkt gemessen

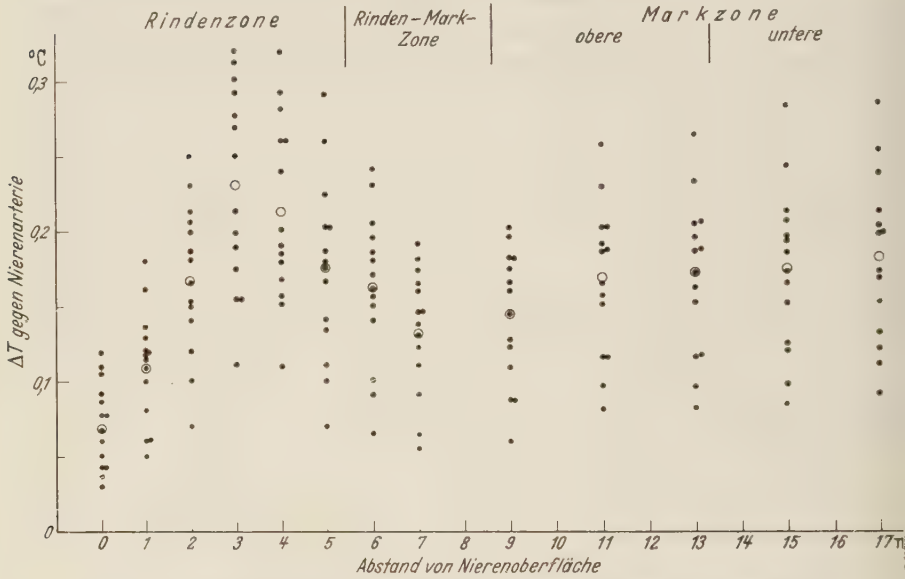


Abb. 6. Temperaturdifferenzen verschiedener Nierenschichten gegen die Nierenarterie

wurde, die entsprechenden Meßwerte zusammengestellt. Insgesamt wurden die Ergebnisse an 56 Hunden (Abb. 7) verwertet. In Versuchen, in denen sich im Laufe der Zeit die Temperaturdifferenzen änderten (21 Hunde), wurden auch ein oder zwei spätere Werte berücksichtigt.

Bei den 56 Versuchstieren war in 45 Fällen die Nierenrinde wärmer als das Mark, in 4 die Temperaturdifferenz gleich groß und in 7 das Mark wärmer als die Rinde. Die durchschnittliche Temperaturdifferenz der Nierenarterie gegen die Nierenrinde betrug 0,162° C, gegen das Nierenmark 0,113° C und gegen die Nierenvene 0,109° C (s. Abb. 5).

3. Temperaturanstieg in verschiedenen Nierenzonen bei Unterbrechung der Zirkulation

Die bisherigen Versuche geben einen Überblick über die Temperaturverteilung in der Niere bei bestehender Zirkulation. Es war nun zu klären, wie sich diese Temperaturverteilung durch Unterbrechung der

Zirkulation verändert. Mit der Methode der Temperaturabtastung war diese Frage nicht zu klären, weil hier in den verschiedenen Nierenausschnitten nicht gleichzeitig gemessen werden konnte. Wir haben deshalb mit unseren festliegenden 2-Nadelelementen die Änderung der Temperaturdifferenz an 2 festgelegten Punkten gemessen: in der Nierenrinde je nach Länge der Nadel im Abstand von 2,5—4 mm von der Oberfläche und im Nierenmark im Abstand von 12—15 mm. Mit diesen Punkten erhalten wir einen Einblick in zwei grundsätzlich voneinander unterschiedene Zonen: Nierenrinde und obere Markzone. Die Zirkulation wurde für 1 bis 3 min bei 20 Hnuden unterbrochen. Die Änderung der Temperaturdifferenz in Rinde und Mark wurde für 1 min Abklemmungszeit berechnet und in Abb. 8 einander gegenübergestellt.

Die Ausgangstemperaturen sind durchschnittlich wieder in der Rinde höher als im Mark. Während der Abklemmung steigt die Temperatur in der Rinde steil, im Mark flacher an. Im Durchschnitt nimmt der Temperaturunterschied in der Nierenrinde in 1 min um 0,089° C, im Nierenmark um 0,043° C zu.

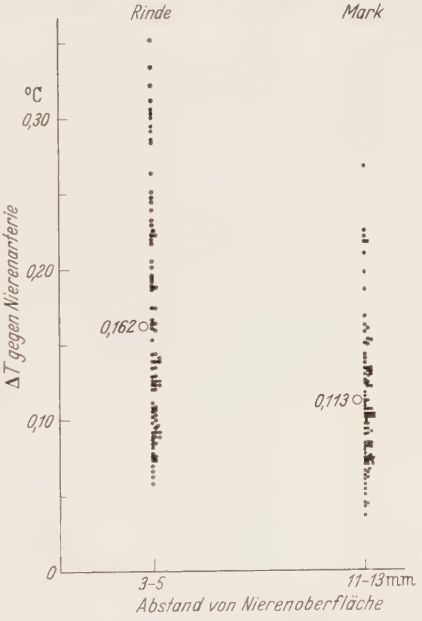


Abb. 7. Temperaturdifferenz Nierenrinde bzw. Nierenmark gegen die Nierenarterie. Zusammenstellung der Meßwerte an 56 verschiedenen Nieren

Diskussion

Die vorliegenden Versuche befassen sich mit der Methode der Temperaturmessung des Nierenblutes und des Nierenparenchyms an verschiedenen Stellen. Gegenüber dem früher von Janssen u. Rein geübten Verfahren einer Temperaturmessung des Blutes an der Gefäßwand erscheint die Methode der Temperaturmessung im strömenden Blut besser und ergibt größere Differenzen. Die Messungen nähern sich mehr den wirklichen Verhältnissen und sind von den Einflüssen des umgebenden Gewebes unabhängig.

Wir konnten feststellen, daß das Blut in der Aorta vom Zwerchfell bis zur Nierenarterie keine Temperaturänderungen erleidet. Deshalb ist es erlaubt, die Messung des in die Niere fließenden Arterienblutes bereits in der Aorta am Abgang der Nierenarterie vorzunehmen. Der gleiche Befund wurde für die Temperatur des Nierenvenenblutes für die Strecke

von den Venae arcuatae bis 1 cm vor der Einmündung der Vena renalis in die Vena cava erhoben.

Vorübergehende, nicht nur auf die Niere zu beziehende Schwankungen der Bluttemperatur können schon durch geringe Mengen ungleich temperierter Injektionslösungen hervorgerufen werden. Auch durch plötzliche Umstellung des allgemeinen Kreislaufs, z. B. durch Adrenalininjektion, werden Blutmengen anderer Temperatur in den

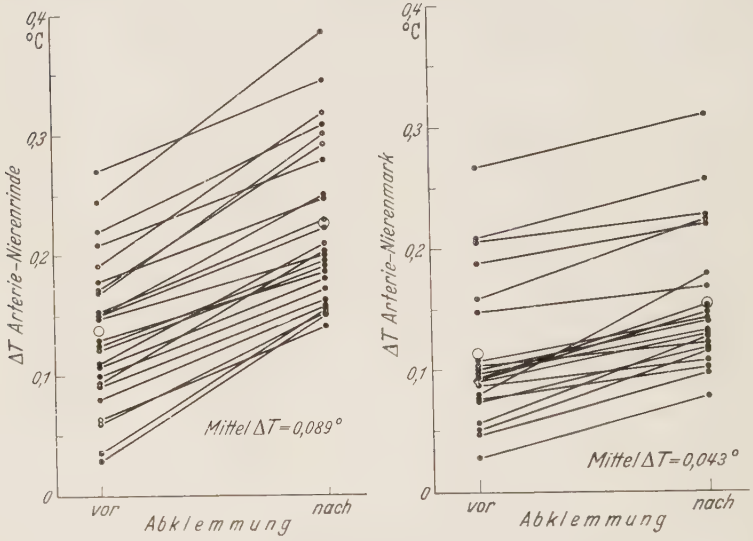


Abb. 8. Bewegung der Temperaturdifferenzen in Nierenrinde und Nierenmark bei Unterbrechung der Nierenzirkulation für 1 min

Kreislauf hineingebracht. Deshalb ist eine fortlaufende Kontrolle der Temperatur des Arterienblutes gegen eine konstante Temperatur (Thermostat) notwendig, wobei hinzukommt, daß im Verlaufe eines längeren Versuches die Körpertemperatur des Versuchstieres schwer konstant gehalten werden kann.

Die Temperatur*verteilung* in der Niere ist ungleichmäßig. Wie Ochwadt u. Schmier (1954) fanden auch wir die Temperatur in der Gefäßzone an der Mark-Rindengrenze am niedrigsten. Von dort steigen die Temperaturen gegen die Rinde und gegen das Mark zu an. Bei unseren Messungen mit beweglichen Thermonadeln wurde jedoch die durchschnittliche Temperaturdifferenz in der Rinde (0,215° C) höher gefunden als die im Mark (0,165° C). Eine Zusammenstellung aller Versuche (56 Hunde) mit fixierten Thermonadeln gab ein ähnliches Bild: die Temperaturdifferenz gegen das Nierenarterienblut betrug hierbei in der Rinde 0,162° C, im Mark 0,113° C. Auch bei den Ausgangswerten für die

Drosselversuche (Abb. 8) war die Nierenrinde — durchschnittlich 0,136° C — und das Mark — 0,115° C — wärmer als das Arterienblut. Nur selten (in 7 von 56 Versuchen) wurde die Temperatur im Mark höher gefunden als in der Rinde. Es kann also als sicher gelten, daß die Temperaturen in der Nierenrinde trotz der höheren Blutzirkulation und damit des größeren Kühleffektes des Blutes, höher sind als im Mark.

Diese Tatsache findet ihre Erklärung in dem Befund, daß im Bereich der Nierenrinde die Wärmebildung doppelt so hoch ist wie im Mark, wie wir bei der Aufhebung der Nierenzirkulation feststellen konnten. Tatsächlich ist auch der Basalstoffwechsel, gemessen in der Warburg-Apparatur, in der Nierenrinde wesentlich höher als in allen anderen Geweben des Körpers (Krebs, 1950). Die Gewebe der verschiedenen Nierenzonen verbrauchen unterschiedliche Mengen Sauerstoff (Grupp u. Hierholzer, 1956). Die Nierenrindenschnitte haben die höchste Atmung, Schnitte aus dem oberen Mark, direkt an der Rindenmarkzone, atmen 25% und Schnitte aus dem tiefen Mark 50% weniger.

In Würdigung aller dieser Tatsachen sind wir im Gegensatz zu Ochwadt u. Schmier der Auffassung, daß in der Niere in dem Querschnitt, den wir beobachtet haben, nämlich 0—15 mm von der Oberfläche ab gerechnet, erhebliche Unterschiede in der Wärme*produktion* einzelner Zonen anzutreffen sind. Der Beobachtungsbereich reicht bei der Hundeniere bis in das tiefe Mark in den Nierenpapillen.

Die Kenntnis der Temperaturverteilung in den verschiedenen Schichten der Niere und ihre Veränderung bei der Aufhebung der Zirkulation zeigt, daß die Nierenrinde nicht nur in der Masse, sondern auch in der Temperatur und damit auch in ihrem Wärmeinhalt (Calorien) das Mark übertrifft. Man muß also nach den vorliegenden Befunden annehmen, daß in der Rinde ein großer chemischer Umsatz vorliegt.

Wir glauben, daß mit dieser Methode der Messung des Wärmeausflusses durch die Nierenvene unter Berücksichtigung des veränderlichen Wärmeinhaltes der Niere eine wesentliche Grundlage für die Untersuchung des Wärmehaushaltes und damit der Wärmebildung der Niere gegeben ist.

Zusammenfassung

Die Verteilung der Temperatur über den Nierenquerschnitt bei bestehender Durchblutung ist verschieden. Im Bereich der großen Gefäße in der Rinden-Mark-Zone ist ihr Minimum. Sie steigt gegen die Rinde steil, gegen das Mark flach an. Bei Unterbrechung der Nierenzirkulation ist die Temperaturzunahme in der Rinde doppelt so hoch wie im Mark. Demnach sind die einzelnen Nierenzonen in ihrer Wärmebildung verschieden.

Literatur

Aschoff, J., u. R. Wever: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforsch. 1956. — Baumgartner, G., G. Grupp u. S. Janssen: Pflügers Arch. **261**, 575 (1955). — Bonsmann, M. R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **156**, 160 (1930). — Grab, W., S. Janssen u. H. Rein: Z. Biol. **89**, 324 (1929). — Grupp, G., u. K. Hierholzer: Z. Biol. (im Druck). - Janssen, S., u. H. Rein: Ber. ges. Physiol. **42**, 566 (1927). — Krebs, H. A.: Biochim. et Biophysica Acta **4**, 249 (1950). — Kügelgen, A. v.: Ber. int. Anat. Kongr. Stockholm 1956. — Neth, W.: Inaug. Diss. Freiburg/Br. 1955. — Oberdorf, A., u. O. Wilcke: Z. exper. Med. **124**, 209 (1954). — Ochwadt, B., u. J. Schmier: Pflügers Arch. **258**, 261—274 (1954). — Rein, H., u. S. Janssen: Ber. ges. Physiol. **42**, 565 (1927). — Soskin, S., W. S. Priest and W. J. Schutz: Amer. J. Physiol. **108**, 107 (1934). — Walz, G.: Inaug. Diss. Freiburg/Br. 1955. — Wever, R.: Pflügers Arch. **262**, 1 (1955).

Prof. Dr. S. Janssen, Pharmakologisches Institut Freiburg/Br., Katharinenstr. 29

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 257—273 (1957)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik (Ludolf-Krehl-Klinik) Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. K. Matthes)

Die Wirkung von 5-Hydroxytryptamin auf Blutdruck, Haut- und Muskeldurchblutung des Menschen*

Von
K. D. Bock, H. Dengler, H. M. Kuhn und K. Matthes

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. Dezember 1956)

Die komplizierten Kreislaufwirkungen des 5-Hydroxytryptamins (5-HT) haben in der kurzen Zeit, in der die synthetische Substanz zugänglich ist, das Interesse zahlreicher Untersucher gefunden.

An isolierten Organen (Arterien-Ring-Präparat, isoliertes Kaninchenohr) besitzt 5-HT bis herunter zu Konzentrationen von 10^{-8} eine starke vasoconstrictorische Wirkung, die auch in der Nomenklatur der Substanz — Serotonin, Vasoconstrictine — ihren Ausdruck fand (Lit. bei Erspamer, 1954). Am Lungenkreislauf verursacht 5-HT bei i.v. oder i.a. (A. pulmonalis) Injektion eine Zunahme des Gefäßwiderstandes (Reid, 1952; Comroe u. Mitarb., 1953; McCannon u. Horvath, 1954). Auch die Nierengefäße werden durch Injektion von 5-HT in die A. renalis verengert (Reid, 1952; Ginzel u. Kottegoda, 1953; Cerletti, Carpi u. Rothlin, 1954); dagegen sollen am wachen Hund bei i.v. Infusion kleiner Dosen die renalen Gefäßwiderstände abnehmen (Corcoran u. a., 1954). Nach v. Bubnoff (1956) ist an der isolierten Katzenniere auch bei i.a. Injektion keine Vasokonstriktion zu erreichen und bei künstlich erhöhtem Gefäßtonus tritt sogar eine Vasodilatation ein. Die Befunde über die Extremitätendurchblutung unter 5-HT sind ebensowenig einheitlich. An der Hinterextremität der Katze fanden Reid u. Rand (1952) sowie Reid (1952) bei i.a. Gabe von 1 γ 5-HT und darüber eine Abnahme des venösen Ausflusses, der oft eine kurze initiale Steigerung vorausging (vgl. auch Ginzel u. Kottegoda, 1953). Größere i.v. Dosen führten ebenfalls zu Durchblutungsabnahmen, gelegentlich unterbrochen durch eine druckpassive Mehrdurchblutung. Volumenplethysmographische Messungen zeigten nach i.v. und i.a. Injektion eine Volumenabnahme, der bei i.a. Verabreichung eine kleine initiale Zunahme vorausging. An der isolierten, konstant durchströmten Hinterextremität des Hundes fanden Page (1952) und Page u. McCubbin (1953) nach i.a. Gaben eine Vasoconstriction; dagegen bewirkte i.a. Zufuhr von 5-HT bei erhaltener nervöser Verbindung einen Abfall des arteriellen Druckes im Bein. Kottegoda u. Mott (1955) beobachteten eine Durchblutungszunahme in der Hinterextremität der Katze nach i.v. Gaben von 100—150 γ 5-HT. Am Menschen wurde von Roddie, Shepherd u. Whelan (1955) nach Infusion kleiner (1—16 γ/min) Mengen von 5-HT in die A. brachialis mittels der venösen Verschlußplethysmographie eine Abnahme der Durchblutung von Unterarm und Hand sowie des Wärmestromes der Haut der

* Herrn Prof. Dr. R. Meier, Basel, zum 60. Geburtstag gewidmet.

Mittelfingers gefunden; gleichzeitig nahm das Volumen von Unterarm und Hand zu, und es zeigte sich ein „flush" der Haut, der an den Fingern teilweise in Cyanose überging und vereinzelt Petechien hinterließ. Der Durchblutungsabnahme am Unterarm ging eine kurze Zunahme voraus. Cali u. Lomeo (1956) sahen am Menschen nach i.a. Injektionen von 5-HT in die A. brachialis ebenfalls eine Zunahme des Finger- und Unterarmvolumens bei gleichzeitiger Capillarerweiterung, Abnahme der Hauttemperatur und Anstieg des Venendruckes.

Diese unterschiedlichen, zum Teil auch speciesabhängigen Ergebnisse waren Veranlassung, die Wirkung von 5-HT auf die Extremitätendurchblutung und den Blutdruck des Menschen erneut zu prüfen, zumal die Kenntnis, in welcher Weise 5-HT die Extremitätengefäße, besonders die der Haut, und den Blutdruck beeinflußt, auch von klinischem Interesse ist, seitdem die gesteigerte Ausschüttung von 5-HT als pathogenetischer Faktor im Krankheitsbild des metastasierenden Carcinoids erkannt wurde (Lembeck, 1953, 1954; Ratzenhofer u. Lembeck, 1954, 1955; Langemann, 1955; Feyrter, 1956). Bei diesem werden sowohl Blutdrucksteigerungen als auch Kollapse und andere vasomotorische Erscheinungen („flush", Hitzewallungen) beobachtet. Es erschien dabei notwendig, die Strombahn von Haut und Muskulatur zur Erfassung etwaiger unterschiedlicher Reaktionen getrennt zu untersuchen und wegen der Möglichkeit rasch ablaufender Kreislaufänderungen fortlaufend registrierende Methoden anzuwenden. Vergleichsweise wurde in Ergänzung zu einer früheren Arbeit (Bock, Hensel u. Ruef, 1955) Adrenalin und Noradrenalin mitgetestet.

Methodik

An 8 gesunden männlichen Versuchspersonen (Vpn.) im Alter von 19 bis 29 Jahren wurden insgesamt 13 Versuche vorgenommen. Bei einer Raumtemperatur von 19°—23° C lagen die Vpn. bequem auf einem weichgepolsterten Untersuchungsbett und waren mit Wolldecken soweit abgedeckt, daß Behaglichkeitsgefühl bestand; in den folgenden 1½—2 Std wurde die Meßapparatur angebracht. Der anschließende eigentliche Versuch dauerte 1½—3 Std.

Fortlaufend registriert wurden:

1. Der *arterielle Blutdruck* blutig mit einem Lilly-Kondensatormanometer in der A. cubitalis des li. Armes.

2. Die *Muskeldurchblutung* mit der Wärmeleitsonde nach Hensel im M. gastrocnemius (10 Versuche) oder im M. brachioradialis (3 Versuche). Einzelheiten zur Methodik siehe bei Hensel (1954), Hensel u. Ruef (1954), Hensel u. Bock (1955). Die einwandfreie Lage der Sonde wurde zu Beginn und am Ende der Versuche durch arterielle Drosselungen geprüft, Eichung in Prozent der Ruhedurchblutung.

3. Der *Wärmestrom der Haut* als qualitatives Maß für die Hautdurchblutung mit einem Strömungscalorimeter (Hensel, 1951, 1952) am Unterschenkel oder am Daumenballen.

Die unmittelbare visuelle Beobachtung der Haut nach i.a. Injektion war unter unseren Versuchsbedingungen nicht möglich, da das zur Registrierung benutzte Glied sorgfältig mit Watte wärmeisoliert war.

Die *intravenösen* Injektionen bzw. Infusionen der geprüften Substanzen wurden durch eine mit Mandrin verschlossene Kanüle gegeben, die in eine Armvene

eingelegt war. Die *intraarteriellen* Gaben erfolgten dicht unterhalb des Leistenbandes in die A. femoralis des gleichen Beines, an dem jeweils Muskeldurchblutung und Wärmestrom der Haut gemessen wurde. Zur Vermeidung von Irritationen der Arterienwand durch Manipulationen an der Nadel bei Injektionen bzw. Infusionen wurde die eingelegte Kanüle örtlich gut fixiert und mit einem sehr dünnen Venoflex-Schlauch verbunden, der zu einem unmittelbar neben dem Untersuchungsbett befestigten Verbindungsstück führte. Über dieses Verbindungsstück war die Arterienkanüle angeschlossen an eine Infusionspumpe (Fa. Braun, Melsungen), mittels derer zur Offenhaltung der Kanüle eine konstante langsame (0,25 cm³/min) Infusion von 0,9% NaCl-Lösung in die A. femoralis vorgenommen wurde. Die i.a. Injektionen erfolgten über einen seitlichen Ansatz des Verbindungsstückes bei gleichzeitiger Unterbrechung der NaCl-Infusion; nach den Injektionen wurden jeweils sofort 2 cm³ NaCl-Lösung nachgespritzt, um den Totraum (0,5 cm³) des Systems vollständig von der Testsubstanz zu säubern. Wiederholte Kontrollinjektionen mit 0,9% NaCl-Lösung zeigten, daß bei dieser Anordnung die i.a. injizierte Flüssigkeitsmenge und Injektionsgeschwindigkeit in den von uns verwandten Größenordnungen als solche keinen nachweisbaren Einfluß auf die Durchblutungsverhältnisse der distalen Abschnitte des Beines hatten.

Als Substanzen wurden verwendet:

1. Hydroxytryptaminhydrochlorid[1], gelöst in 0,9%iger steriler pyrogenfreier NaCl-Lösung. In einigen Versuchen wurde die Wirkung mit der des Hydroxytryptaminkreatininsulfates bei i.a. Injektion verglichen. Dabei zeigte sich bei gleichen Dosen (berechnet auf freie Base) kein Unterschied.

2. l-Noradrenalin und

3. l-Adrenalin, beide in stabilisierter Lösung (aus Ampullen zu 20 γ).

Die angegebenen Dosen beziehen sich jeweils auf den Gehalt an freier Base.

4. Regitin(Wz)(2-N-p-tolyl-N-m-oxyphenyl-aminomethyl-imidazolin) 0,3 mg/kg.

Ergebnisse

1. Intraarterielle Injektionen

5-HT in Dosen der Größenordnung 0,1—100 γ in die A. femoralis injiziert bewirkt mit einer Latenz von durchschnittlich 35 sec Dauer im M. gastrocnemius des gleichen Beines eine Mehrdurchblutung von 200—300% der Ruhedurchblutung und 60—100 sec Dauer, welche in manchen Fällen von einer geringfügigen kürzeren Durchblutungsabnahme gefolgt ist (Abb. 1, 2, 3, 8). Eine Steigerung der Dosis verstärkt Ausmaß und Dauer der sekundären Vasoconstriction und vermindert gelegentlich die primäre Vasodilatation (Abb. 1, 2). In 2 min Abstand aufeinander folgende Injektionen kleiner 5-HT-Dosen erzeugen jeweils die gleiche Reaktion an den Muskelgefäßen, eine Tachyphylaxie besteht unter diesen Bedingungen nicht (Abb. 3). Bei intraarterieller Dauerinfusion von 5-HT (Abb. 4) tritt ebenfalls zunächst eine kurzfristige Dilatation des Muskelgefäßnetzes auf, der im Versuch der Abb. 4 zwei weitere, jedoch in ihrem Ausmaß zunehmend geringere Dilatationen

[1] Herrn Prof. Haas, Knoll A.G., und der Fa. C. H. Boehringer, Ingelheim danken wir für die Überlassung der Substanzen.

folgen. Dann stellt sich die Muskeldurchblutung für die Dauer der Infusion auf einen Wert ein, der im Bereich der Ruhedurchblutung oder dicht darunter liegt.

Die Hautdurchblutung, beurteilt nach der Größe des Wärmestroms der Haut am Unterschenkel distal von der Injektionsstelle, nimmt — soweit sie überhaupt eine nachweisbare Reaktion zeigt — ab, und zwar

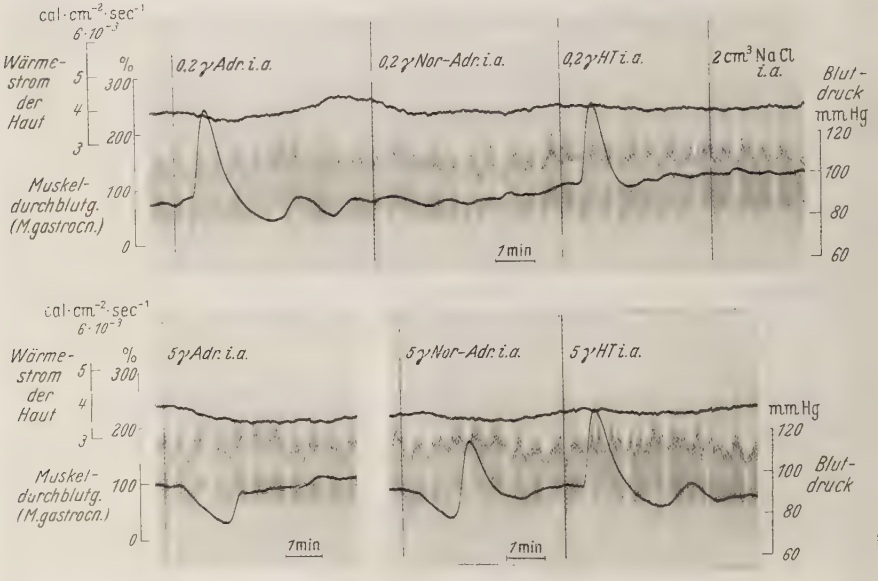


Abb. 1. Vp. Bu. Wirkung gleichgroßer i.a. Dosen von Adrenalin, Noradrenalin und 5-HT auf Blutdruck, Haut- und Muskeldurchblutung (Unterschenkel). Oben: Jeweils 0,2 γ i.a. und Kontrollinjektion mit 2 cm³ 0,9% NaCl. Unten: Jeweils 5 γ i.a. Die Signale bezeichnen den Injektionsbeginn

sowohl bei Einzelinjektionen wie bei Dauerinfusion (Abb. 1, 4, 8). Der Blutdruck ändert sich unter den hier angewandten i.a. Dosen von 5-HT nicht. Druckpassive Durchblutungsänderungen sind daher auszuschließen.

Subjektive Erscheinungen der Art, wie sie bei i.v. Injektion größerer 5-HT-Dosen auftreten, fehlten bei i.a. Injektion. Lediglich nach größeren i.a. Dosen (100—500 γ 5-HT) wurde von einigen Versuchspersonen ein „ziehendes", unangenehmes Gefühl von mehreren Sekunden Dauer im Bein angegeben.

Die Befunde bei i.a. Injektionen und Infusionen von Adrenalin und Noradrenalin entsprechen im wesentlichen früher mitgeteilten (vgl. Bock, Hensel u. Ruef, 1955, s. dort weitere Einzelheiten und Lit.). Adrenalin bewirkt in kleinen Dosen i.a. eine Vasodilatation im Muskel, welche bei Steigerung der Dosis in eine Vasoconstriction übergeht (z. B. Abb. 1). Nach Noradrenalin i.a. kommt es

entweder nur zu einer Abnahme der Muskeldurchblutung oder zu einer mehrphasigen Reaktion, die meist in einer kleinen (50% der Ruhedurchblutung selten überschreitenden) primären Zunahme und sekundären Abnahme der Durchblutung besteht. Gelegentlich wird auch eine primäre Vasoconstriction und sekundäre Dilatation beobachtet (z. B. Abb. 1) oder die Vasoconstriction fehlt ganz. Die Hautdurchblutung wird sowohl durch Adrenalin wie auch durch Noradrenalin vermindert

Abb. 2. Die Wirkung steigender i.a. Dosen von 5-HT auf die Muskeldurchblutung (M. gastrocnemius) bei 3 verschiedenen Vpn. Blutdruckänderungen traten in keinem Falle auf. ↑ = Injektionsbeginn

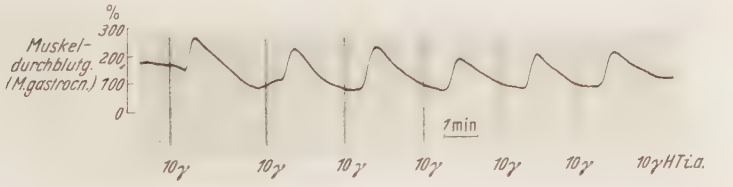


Abb. 3. Vp. Fr. Die Wirkung von 10 γ 5-HT auf die Muskeldurchblutung (M. gastrocnemius) bei i.a. Injektionen in 2 min-Abständen. Signale = Injektionsbeginn

(Abb. 1, 8). Blutdruckänderungen werden bei i.a. Gabe beider Substanzen in der Regel nicht beobachtet, druckpassive Durchblutungsänderungen sind also auch hier auszuschließen.

Der Vergleich von 5-HT mit den Katecholaminen in ihrer lokalen peripheren Gefäßwirkung ergibt formal eine gewisse Ähnlichkeit von 5-HT und Adrenalin. Die Ähnlichkeit betrifft die dilatierende Wirkung kleiner, eben überschwelliger Dosen auf die Muskelgefäße mit stärker werdender sekundärer Konstriktion bei Steigerung der Dosis; auch die

Durchblutungsdrosselung der Haut ist beiden Substanzen gemeinsam. Unterschiedlich sind jedoch die Dosisbereiche, in denen die Dilatation der Muskelgefäße in eine Vasoconstriction übergeht; sie liegen bei 5-HT höher (Abb. 1, 2) als bei Adrenalin.

Einen Überblick über sämtliche i.a. 5-HT-Einzelinjektionen gibt Tab. 1, aus der besonders die Konstanz der erhaltenen Ergebnisse hervorgeht.

Tabelle 1. *Reaktion von Muskel- und Hautdurchblutung auf 47 intraarterielle Injektionen von 5-HT*

Dosis-Bereich	Anzahl der Injektionen	Muskeldurchblutung				Hautdurchblutung		
		Zunahme	Prim. Zunahme + sek. Abnahme	Nur Abnahme	Keine Reaktion	Zunahme	Abnahme	Keine Reaktion
bis 0,5 γ	19	7	4	—	7	—	5	8
1—50 γ	23	13	5	—	1	—	15	5
mehr als 60 γ . . .	5	2	3	—	—	—	—	4
Zusammen	47	Nicht sicher verwertbare Reaktionen sind nicht mit angeführt						

2. Intravenöse Injektionen

Intravenöse Gaben von 5-HT erzeugen erst in Dosen von der Größenordnung 100 γ an aufwärts nachweisbare Wirkungen auf die untersuchten Kreislaufgrößen. Wegen der sehr unangenehmen subjektiven Beschwerden bei i.v. Gaben von 1—3 mg 5-HT wurde die Dosis von 3 mg nicht überschritten.

Auch i.v. führt 5-HT zu einer Mehrdurchblutung der Muskulatur (Abb. 5, 6, 9), welche der mit entsprechend kleineren Dosen i.a. erzeugten Durchblutungszunahme in Größe und zeitlichem Ablauf außerordentlich ähnelt [vgl. z. B. die Reaktion der Muskeldurchblutung auf 3 mg 5-HT i.v. (Abb. 6) und 1 γ i.a. (Abb. 8), beide aus dem gleichen Versuch]. Eine Durchblutungsabnahme wurde im Muskel im Bereich der angewandten i.v. Dosen nicht beobachtet.

Blutdruckänderungen nach i.v. Gabe von 5-HT treten ebenfalls erst bei Dosen von 100 γ an auf. Es kommt zuerst zu einem kurzen Blutdruckabfall, systolisch stärker als diastolisch, dem bei höheren Dosen ein Anstieg folgen kann (Abb. 5, 6), jedoch nicht muß (Abb. 9). Die maximale Dauer einer derartigen sekundären Blutdrucksteigerung nach einer Einzelinjektion betrug 5 min (Abb. 6). Über gleichzeitige Pulsfrequenzänderungen können keine sicheren Angaben gemacht werden, da die Pulsfrequenz nicht mitregistriert wurde. Unmittelbar nach der

i.v. Injektion von 5-HT beobachteten wir eine kurzfristige Hemmung, anschließend eine Vertiefung und Beschleunigung der Atmung. Subjektiv besteht das Gefühl der Atemnot.

Läßt noch das zeitliche Zusammenfallen von Mehrdurchblutung des Muskels und Blutdrucksteigerung im Versuch der Abb. 6 eine druckpassive Durchblutungszunahme möglich erscheinen, so tritt in den Versuchen der Abb. 5 u. 9 der Anstieg der Durchblutung zu einem Zeitpunkt auf, in dem der Blutdruck fällt; außerdem kommt die Mehrdurchblutung des Muskels nach i.v. Injektion von 5-HT auch ohne jede Drucksteigerung zustande (Abb. 9).

Das zum Beginn der Blutdruckänderungen zeitlich später liegende Einsetzen der Muskelmehrdurchblutung im Versuch der Abb. 6 gegenüber Abb. 5 und 9 kann

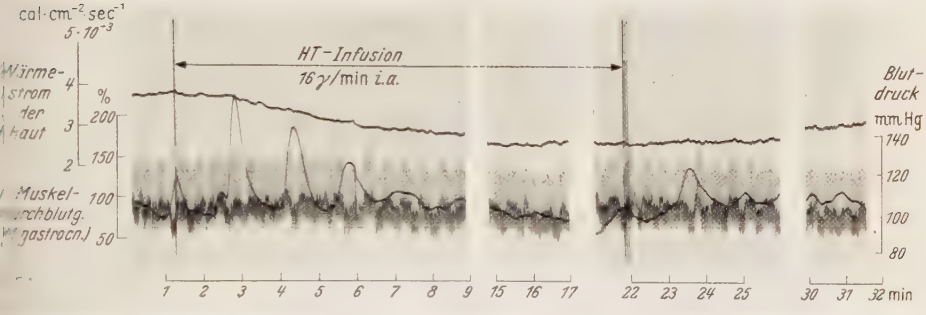


Abb. 4. Vp. St. Die Wirkung einer i.a. Dauerinfusion von 5-HT (16 γ/min) auf Blutdruck, Haut- (obere Kurve) und Muskeldurchblutung (untere Kurve) am Unterschenkel

damit zusammenhängen, daß bei den letzteren die Durchblutung am Unterarm, im Versuch der Abb. 6 am Unterschenkel registriert wurde. Eine etwa gleichgroße zeitliche Verspätung (8—15 sec), bezogen auf den Beginn der Blutdruckwirkung, hat die Mehrdurchblutung der Wadenmuskulatur gegenüber der Unterarmmuskulatur nach i.v. Gabe von Adrenalin. Die Latenzzeit vom Beginn der Injektion bis zum Beginn der Mehrdurchblutung des Muskels ist bei i.v. Gabe von 5-HT durchschnittlich 15 sec länger als bei i.a. Injektion; der Wert ist jedoch unsicher, da wegen der schlechten Verträglichkeit höherer Dosen von 5-HT i.v. langsamer als i.a. injiziert wurde.

Die Hautdurchblutung nimmt in gleicher Weise nach i.v. wie nach i.a. Injektion von 5-HT ab. Eine Mehrdurchblutung der Haut wurde bei insgesamt 32 i.v. Injektionen nur einmal beobachtet.

Die quantitativen Unterschiede im Verhalten des Wärmestroms der Haut auf den Abb. 5 und 9 gegenüber den Abb. 1, 4, 6, 7, 8 sind dadurch bedingt, daß in den Versuchen der Abb. 5 und 9 an der lebhaft reagierenden, gut durchbluteten Haut der Hand, in den übrigen abgebildeten Versuchen am Unterschenkel gemessen wurde.

Adrenalin und Noradrenalin führen i.v. in Dosen zwischen 1 und 50 γ — höhere Dosen werden i.v. als Einzelinjektionen schlecht vertragen — zu den gleichen Änderungen der Haut- und Muskeldurchblutung wie die i.a. Injektion entsprechend

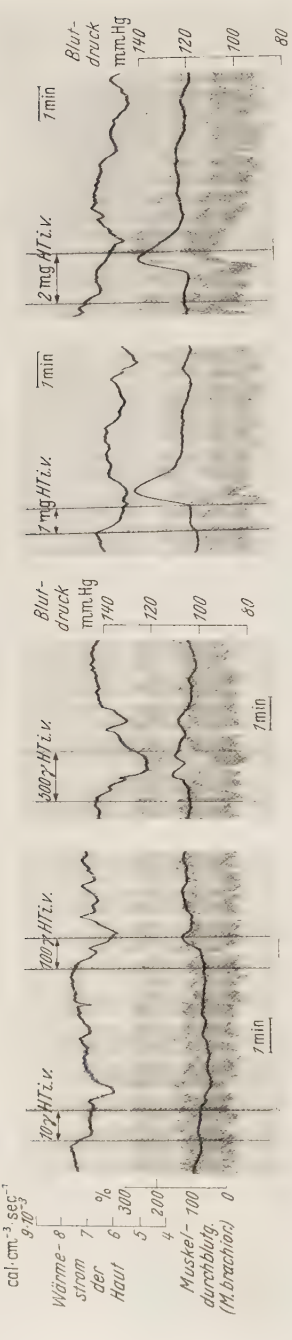


Abb. 5. Vp. Ha. Die Wirkung steigender Dosen von 5-HT i.v. auf Blutdruck, Haut- (obere Kurve, Daumenballen) und Muskeldurchblutung (untere Kurve M. brachiorad.). Die Injektionen erfolgten jeweils zwischen den Signalen

kleinerer Mengen (Abb. 9). Die Reaktion des Blutdrucks auf Adrenalin in diesem Dosisbereich ist dreiphasig: Primäre kurze Zunahme, sekundäre deutliche Abnahme, tertiäre Zunahme; letztere fehlt bei kleinen und wächst mit steigenden Dosen. Der Blutdruckabfall geht mit Tachykardie einher. Noradrenalin bewirkt in dem gleichen Dosisbereich eine von Bradykardie begleitete systolische und diastolische Blutdrucksteigerung, die in ihrem Ausmaß dosisabhängig ist (Abb. 7, 9). Der Beginn der Mehrdurchblutung des Muskels nach Adrenalin fiel in allen Versuchen, in denen am Arm registriert wurde, zeitlich in die Phase des Blutdruckabfalls, wenn auch Beginn der Blutdrucksenkung und Beginn der Mehrdurchblutung im Muskel meist nicht streng synchron waren. Bei Versuchen, in denen am Bein registriert wurde, war der Anstieg der Muskeldurchblutung gegenüber dem Beginn der Blutdrucksenkung meist noch stärker verzögert. Die Latenz der Calorimetersonde in der Anzeige rascher Durchblutungsänderungen schätzen wir — auf Grund von Beobachtungen bei der postoligämischen Mehrdurchblutung nach arterieller Drosselung — auf höchstens 1—5 sec. Hierin kann also nicht allein die Ursache der zeitlichen Verschiebung zwischen Drucksenkung und Muskelmehrdurchblutung liegen. Wahrscheinlich spielen dabei auch unterschiedlich lange Transportzeiten des Adrenalins zu den Registrierstellen der Muskeldurchblutung eine Rolle, wobei nicht nur die Differenz Arm-Bein, sondern in viel stärkerem Maße lokale Besonderheiten der Blutversorgung des Bezirks im Muskel, in dem die Sonde liegt, von Bedeutung sind.

Der Wiederanstieg des Blutdrucks erfolgt zu einem Zeitpunkt, zu dem die Mehrdurchblutung im Muskel noch nicht ihr Maximum erreicht hat. Es muß dann also — zum Teil wohl reflektorisch — eine Vasoconstriction in anderen Gefäßgebieten und/oder eine Zunahme des Herzzeitvolumens eingesetzt haben. Die initiale Mehrdurchblutung nach i.v. Einzelinjektionen von Noradrenalin ist

wahrscheinlich zum Teil druckpassiv. Andererseits ist die Vasoconstriction in Haut und Muskulatur bei i.v. Dauerinfusion von Noradrenalin eine Teilursache der einsetzenden Blutdrucksteigerung. Dieser in Abb. 7 deutlich zum Ausdruck kommende Zusammenhang ist eine der Grundlagen der klinisch immer wieder so eindrucksvollen und überlegenen Wirkung des Noradrenalins beim Kollaps durch Versagen des peripheren Kreislaufs.

Auch beim Vergleich der Wirkungen von i.v. verabreichtem 5-HT und Adrenalin in für den Menschen verträglichen Dosen ergeben sich

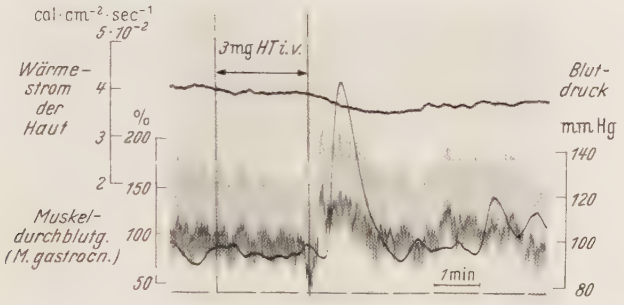


Abb. 6. Vp. St. Intravenöse Einzelinjektion (zwischen den Signalen) von 3 mg 5-HT. Wirkung auf Blutdruck, Haut- (obere Kurve) und Muskeldurchblutung (untere Kurve) am Unterschenkel

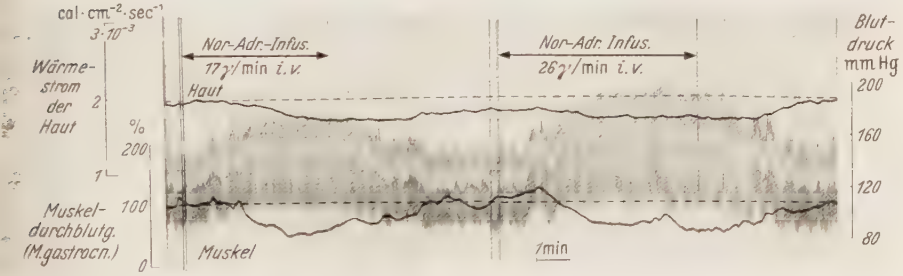


Abb. 7. Vp. We. Die Wirkung von i.v. Dauerinfusionen verschiedener Dosen (17 γ bzw. 26 γ/min) von Noradrenalin auf Blutdruck, Haut- und Muskeldurchblutung (Unterschenkel)

formale Ähnlichkeiten: Mehrdurchblutung des Muskels, Minderdurchblutung der Haut, Blutdrucksenkung. Die i.v. wirksamen Dosen beider Substanzen liegen jedoch um 2—3 Zehnerpotenzen auseinander.

Eine Übersicht über die i.v. erhaltenen Reaktionen mit 5-HT gibt Tab. 2 (S. 266).

3. Die Wirkung von Regitin

Regitin in Dosen von 0,3 mg/kg i.v. beeinflußt die Reaktion der Muskeldurchblutung auf i.a. verabreichtes 5-HT, Adrenalin und Noradrenalin nicht in erkennbarer Weise (Abb. 8). Bei i.v. Gabe dieser Substanzen ist nach Regitin die pressorische Noradrenalinwirkung nicht mehr oder nur noch angedeutet nachweisbar, ebenso fehlen die

Druckanstiege in der mehrphasigen Blutdruckreaktion nach 5-HT und Adrenalin (Abb. 9; die Auslöschung des pressorischen Effekts von 5-HT durch Regitin ist auf dieser Abbildung nicht ersichtlich, weil ein

Tabelle 2. *Reaktion von Blutdruck, Muskel- und Hautdurchblutung auf 32 intravenöse Injektionen von 5-HT*

Dosis-Bereich	Anzahl der Injektionen	Muskeldurchblutung				Hautdurchblutung			Blutdruck		
		Zunahme	Prim. Zunahme + sek. Abnahme	Nur Abnahme	Keine Reaktion	Zunahme	Abnahme	Keine Reaktion	Nur Senkung	Prim. Senkung + sek. Anstieg	Keine Reaktion
bis 60 γ	8	—	—	—	8	—	—	8	—	—	8
100—600 γ	16	7	—	—	8	—	9	5	5	—	11
1—3 mg.	8	5	—	—	1	1	5	1	3	4	1
Zusammen	32	Nicht sicher verwertbare Reaktionen sind nicht mit angeführt									

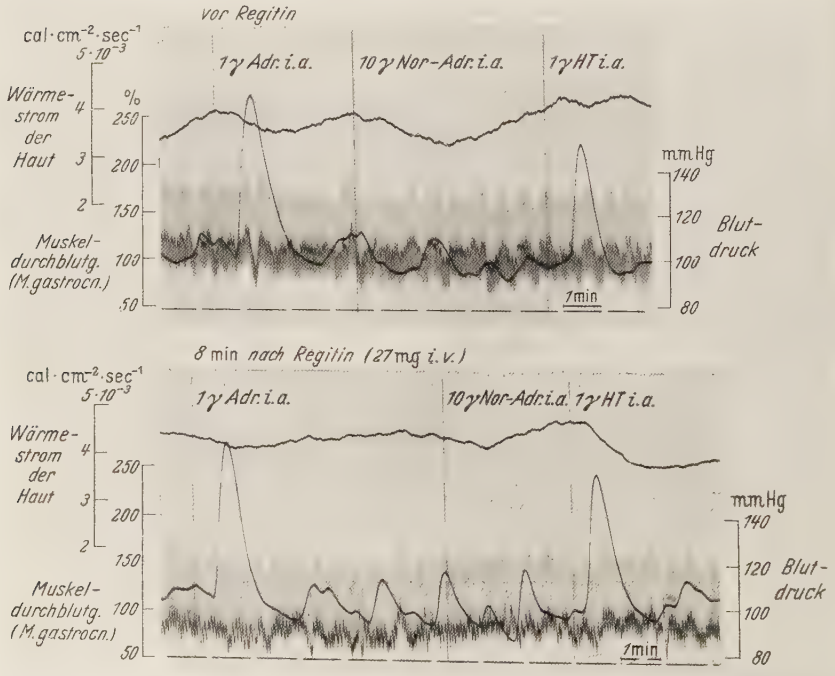


Abb. 8. Vp. St. Die Wirkung von i.a. Gaben von Adrenalin, Noradrenalin und 5-HT auf Blutdruck, Haut- (jeweils obere Kurve) und Muskeldurchblutung (jeweils untere Kurve) des Unterschenkels vor (oberer Teil der Abbildung) und nach (unterer Teil der Abbildung) 27 mg Regitin i.v. Signale = Injektionsbeginn

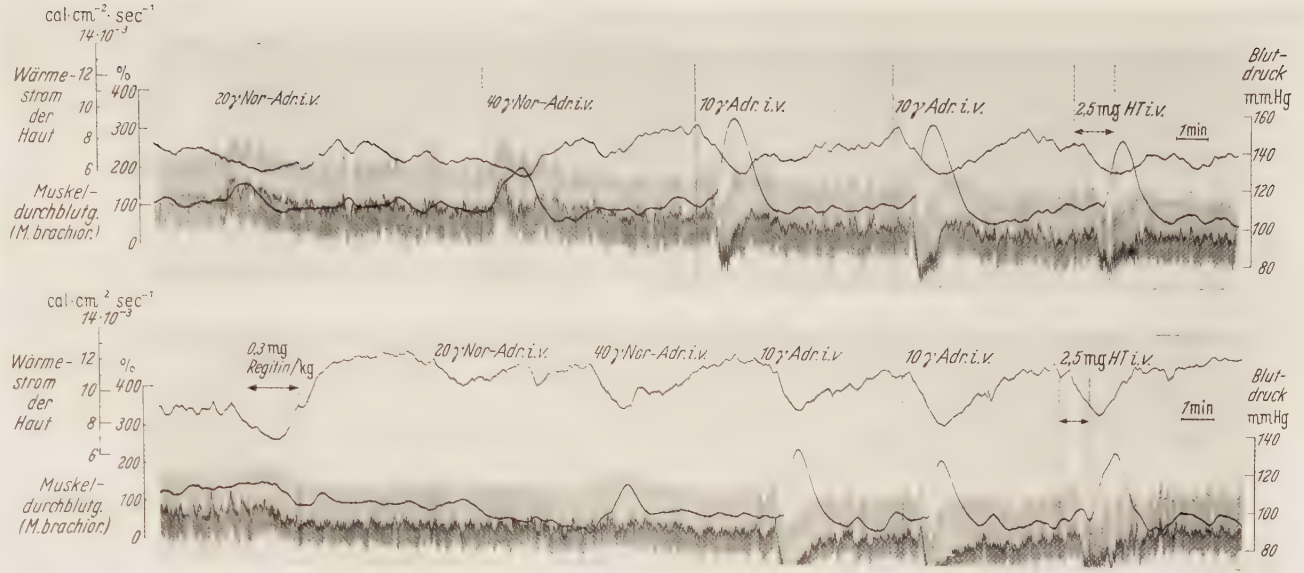


Abb. 9. Vp. Bi. Die Wirkung von i.v. Injektionen von Noradrenalin, Adrenalin und 5-HT auf Blutdruck, Haut- (jeweils obere Kurve, Daumenballen) und Muskeldurchblutung (jeweils untere Kurve, M. brachiorad.) vor und nach 0,3 mg kg Regitin i.v. Signale zu Beginn bzw. zu Beginn und Ende der Injektionen

Druckanstieg hier schon vorher nicht eintrat, kam jedoch in anderen Versuchen deutlich zur Darstellung). Die drucksenkende Wirkung von 5-HT und Adrenalin wird verstärkt, der Wiederanstieg des Druckes erfolgt verzögert (Abb. 9). Die Mehrdurchblutung im Muskel nach 5-HT i.v. zeigt nach Regitin keine verwertbare Änderung ihrer Größe und Dauer; dagegen scheint die Durchblutungssteigerung durch Adrenalin nach Regitin etwas geringer zu werden, vielleicht infolge der stärkeren und länger anhaltenden gleichzeitigen Blutdrucksenkung (Abb. 9). Auch die initiale Durchblutungszunahme im Muskel durch Noradrenalin wird kleiner, wahrscheinlich durch Wegfall des druckpassiven Anteils; die im Versuch der Abb. 9 vor Regitin nur angedeutete sekundäre Vasoconstriction durch Noradrenalin verschwindet danach ganz.

Der quantitative Vergleich der Reaktionen der Hautdurchblutung auf 5-HT, Adrenalin und Noradrenalin vor und nach Regitin wird dadurch sehr erschwert, daß die Ausgangslage der Durchblutung durch das Regitin nach oben verschoben wird. Es ist jedoch erkennbar, daß die durch alle 3 Substanzen i.a. und i.v. erzeugte Durchblutungsabnahme in der Haut nach Regitin noch deutlich vorhanden ist (Abb. 8, 9).

Besprechung der Ergebnisse

Während die Durchblutung der Haut durch 5-HT sowohl bei i.a. wie bei i.v. Gabe in einem weiten Dosisbereich gedrosselt wird, nimmt die Skeletmuskeldurchblutung nach i.a. und i.v. Einzelinjektionen entsprechender Dosen zu, ebenso kommt es im Beginn von i.a. Dauerinfusionen zu einer Mehrdurchblutung des Muskels. Eine Vasoconstriction im Muskel tritt erst bei höheren i.a. Dosen zunehmend in Erscheinung, dagegen nicht im Bereich von für den Menschen i.v. verträglichen Mengen.

Daß die Durchblutungsänderungen in Haut und Muskel sowohl bei i.a. wie bei i.v. Gabe zumindest überwiegend durch peripher-lokalen Angriff des 5-HT zustande kommen, ist aus folgenden Gründen wahrscheinlich:

1. Intraarteriell auf Haut- und Muskeldurchblutung noch deutlich wirksame kleine Dosen rufen weder Blutdruckänderungen noch Allgemeinerscheinungen hervor und sind i.v. gegeben wirkungslos.

2. Größe und Dauer der Mehrdurchblutung des Muskels sind bei i.a. und i.v. Gabe entsprechender wirksamer Dosen von 5-HT außerordentlich ähnlich. Die Mehrdurchblutung des Muskels nach i.v. Injektion kann nicht — und soweit sie mit einer Blutdrucksteigerung zusammenfällt, nicht allein — druckpassiv erklärt werden.

3. Die Latenzzeit vom Injektionsbeginn bis zum Wirkungseintritt ist bei i.a. Injektion kürzer als bei i.v. Die relativ hohen Dosen, die i.v. gebraucht werden, um eine Wirkung auf die hier untersuchten Kreislaufgrößen zu erzielen, können eine Folge der Zerstörung des 5-HT bei der

Passage durch die Lungen (Gaddum u. a., 1953) und der Bindung an die Thrombocyten (Humphrey u. Toh, 1954) sein.

Kottegoda u. Mott (1955) erklären die von ihnen tierexperimentell gefundene Mehrdurchblutung der Extremitäten nach i.v. gegebenem 5-HT, die zusammen mit Bradykardie und Hypotension auftritt, als die Folge eines „coronary chemoreflex" und „pulmonary depressorreflex". In unseren Versuchen war eine Koppelung mit Bradykardie nicht nachzuweisen und auch aus den unter 1. und 3. angeführten Gründen halten wir eine Beteiligung der genannten Reflexe an der Mehrdurchblutung des Muskels beim Menschen für unwahrscheinlich.

Die von uns gefundene Mehrdurchblutung des Muskels nach 5-HT steht im Gegensatz zu den meisten Ergebnissen, die an isolierten Organen und im Tierexperiment gewonnen wurden. Hierbei wurden fast stets Vasoconstrictionen beobachtet; allerdings finden sich auch einzelne Hinweise auf Durchblutungszunahmen (Kottegoda u. Mott, 1955; Page u. McCubbin, 1953) im Bereich der Extremitäten, teilweise werden initiale, der Abnahme vorausgehende kurze Mehrdurchblutungen beschrieben (Reid u. Rand, 1952; Reid, 1952; Roddie, Shepherd u. Whelan, 1955). Die unterschiedlichen Ergebnisse können folgende Gründe haben:

1. Die im Tierversuch angewandten Dosen liegen teilweise so hoch, daß auch im Bereich des Muskels eine Minderdurchblutung eintritt.

2. Es wurde entweder nur die Haut oder die Gesamtdurchblutung einer Extremität, also Haut und Muskel summarisch, untersucht. Auf diese Weise erklären sich die von Roddie, Shepherd u. Whelan am Menschen mittels der venösen Verschlußplethysmographie erhaltenen unterschiedlichen Ergebnisse: Die Gesamtdurchblutung der Hand, welche überwiegend das Verhalten der Hautdurchblutung widerspiegelt, nimmt während einer i.a. 5-HT-Infusion ab, während am Unterarm, einem etwas mehr Muskulatur als Haut enthaltenden Bezirk, eine initiale Durchblutungszunahme gefunden wurde. Die in Abb. 7 der Arbeit von Roddie, Shepherd u. Whelan dargestellten Durchblutungskurven vom Unterarm sind die Resultante aus einem qualitativ verschiedenen Verhalten von Haut- und Muskeldurchblutung, wie es oben in unserer Abb. 4 dargestellt ist.

3. Die Reaktion auf 5-HT ist wahrscheinlich ebenso wie die auf andere Substanzen mit abhängig vom jeweils bestehenden Gefäßtonus, insbesondere von dessen „reflektorischem" (Schaefer, 1952) Anteil. Das geht aus den Versuchen von Page u. McCubbin an der isolierten, von einem Spendertier durchströmten Hinterextremität von Hunden mit „neurogenem" Hochdruck hervor. Intraarterielle Injektion von 5-HT bei erhaltener nervöser Verbindung führte zu einer Vasodilatation im Bein, welche sich in eine Vasoconstriction umkehrte, wenn der „neurogene Tonus" der Extremität durch intrazisternale Injektion von Novocain oder durch Ganglienblocker vermindert oder nach Durchtrennung der Beinnerven aufgehoben war. In unseren Versuchen am nicht narkotisierten Menschen und unter weitgehend physiologischen Verhältnissen war sicher eine zur Erzielung dilatatorischer Effekte geeignetere Ausgangslage vorhanden als bei einem Teil der Untersuchungen an isolierten Organen oder am Tier.

Die initiale Blutdrucksenkung nach i.v. Gabe größerer 5-HT-Mengen könnte zu einem Teil mitbewirkt sein durch die plötzliche Vasodilatation in der Skelettmuskulatur, welche allerdings, bedingt durch verschieden lange Transportwege,

nicht überall gleichzeitig stattfindet. Der Wiederanstieg des Drucks erfolgt dann wahrscheinlich zum Teil reflektorisch und/oder aus anderen, nicht bekannten Gründen unabhängig von einer noch bestehenden Vasodilatation im Muskel. Daß es nach kleinen i.v. gegebenen 5-HT-Mengen jedenfalls zu einer beträchtlichen Abnahme des peripheren Widerstandes kommt, wurde von Schmid, Weltz u. Freund (1956) am wachen Carotisschlingenhund nachgewiesen. Zu den anderen aus dem Tierexperiment erschlossenen Teilfaktoren der Hypotension — vorübergehende Ganglienblockade (Page u. McCubbin, 1953), Constriction der A. pulmonalis (Reid, 1952; McCannon u. Horvath, 1954), hämodynamische Rückwirkungen der Veränderungen der Atmung — kann auf Grund unserer Versuche ebenso wie zur Ursache der sekundären Blutdrucksteigerung nicht Stellung genommen werden.

Die Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin auf Haut- und Muskeldurchblutung entspricht früheren Befunden an Mensch (Lit. bei Barcroft u. Swan, 1953; sowie Bock, Hensel u. Ruef, 1955) und Tier (Lit. bei Gottstein, Hille u. Oberdorf, 1955); die Wirkung auf den Blutdruck den Ergebnissen von Matthes (1951, s. dort weitere Literatur). Der zeitliche Zusammenhang zwischen der Dilatation der Muskelgefäße und der Blutdrucksenkung auf i.v. verabreichte kleine Adrenalindosen, der hier auch für den Menschen durch direkte fortlaufende Messungen erwiesen wurde, spricht dafür, daß die Widerstandsabnahme in der Muskelstrombahn eine der Teilursachen der Blutdrucksenkung ist.

Die Verstärkung der depressorischen Wirkung von 5-HT und die Abschwächung etwa vorhandener pressorischer Effekte bei nicht nachweisbar veränderten Reaktionen der Muskel- und Hautdurchblutung durch Regitin ähnelt den Wirkungen des Regitins auf die Kreislaufveränderungen nach Adrenalin und Noradrenalin (Lit. bei Gross, Tripod u. Meier, 1951; Heinzel, Matthes, Mechelke u. Nusser, 1952; Bernsmeier u. Becker, 1953; Dittmar, Mechelke u. Nusser, 1954; Golenhofen, Hensel u. Ruef, 1955; Gottstein u. Hille, 1955). Daneben bestehen weitere formale Ähnlichkeiten in der Kreislaufwirkung von 5-HT und Adrenalin: Die wahrscheinlich lokal bedingte Durchblutungsabnahme in der Haut und Durchblutungszunahme im Muskel, die drucksenkende Wirkung i.v. verträglicher Dosen, der Übergang der Vasodilatation im Muskel in eine Vasoconstriction bei Steigerung der i.a. Dosis.

Untersuchungen von Balzer u. Holtz (1956) an Blutdruck und Nickhaut der Katze, in denen sich 5-HT wie ein „Intermediärstoff" im Sinne von Fleckenstein verhielt, lassen es nicht ausgeschlossen erscheinen, daß an der peripheren Gefäßwirkung des 5-HT die Freisetzung von Sympathinen beteiligt ist. — Die Unterschiede in den i.v. wirksamen Dosen von 5-HT und Adrenalin könnten die Folge verschiedener Abbau- bzw. Inaktivierungsmechanismen und -orte sein. An der Gesamtwirkung des 5-HT ist — zumindest bei manchen Tierarten — eine Adrenalinfreisetzung aus den Nebennieren beteiligt (Lit. bei Erspamer, 1954).

Im klinischen Krankheitsbild des metastasierenden Carcinoids spielen vasomotorische Erscheinungen eine besondere Rolle. Neben Kollapsen und Blutdrucksteigerungen (Lit. bei Feyrter, 1956), welche durch den

Befund einer mehrphasischen, in ihrem pressorischen Anteil wohl dosisabhängigen Blutdruckwirkung des 5-HT erklärt werden könnten, kommen besonders häufig anfallsweise auftretende Hautrötungen („flush") vor. Dabei ist der Blutdruck vorübergehend erniedrigt, anschließend erhöht (Sjoerdsma, Weissbach u. Udenfried, 1956). Pernow u. Waldenström (1954) und Langemann (1956) konnten während derartiger „flushs" erhöhte Blutwerte von 5-HT nachweisen, nicht dagegen Sjoerdsma u. a. (1956). „Flushing" und unter Umständen Cyanose läßt sich auch bei Gesunden durch i.a. Infusion von 5-HT erzeugen (Roddie, Shepherd u. Whelan, 1955), so daß es naheliegt, diese Erscheinungen im klinischen Krankheitsbild auf die Ausschüttung von 5-HT zu beziehen.

Dem scheint der von uns erhobene Befund einer Abnahme der Hautdurchblutung unter 5-HT zu widersprechen, der in Übereinstimmung steht mit den Ergebnissen von Roddie u. a., welche eine Abnahme der plethysmographisch gemessenen Handdurchblutung und der Wärmeabgabe des Fingers bei i.a. Infusion von 5-HT beobachteten; gleichzeitig nahm das Volumen der Hand zu. Cali u. Lomeo (1956) fanden nach 5-HT i.a. eine Erniedrigung der Hauttemperatur, ebenfalls eine Volumenzunahme des Fingers, eine Capillarerweiterung in der Haut und einen Venendruckanstieg. Eine starke venoconstrictorische Wirkung von intradermal oder subcutan verabreichtem 5-HT ist bereits aus den Versuchen von Reid (1952) bekannt. Der Befund einer — mit den verschiedensten Methoden bestätigten — herabgesetzten Durchblutung der Haut bei gleichzeitiger Volumenzunahme vorwiegend aus Haut bestehender Körperteile, die Capillarerweiterung in der Haut und das Auftreten von Cyanose spricht dafür, daß der „flush" Folge einer passiven Hyperämie (Cali u. Lomeo), einer Stase in der Haut ist.

Zusammenfassung

In 13 Versuchen an gesunden Menschen wird die Wirkung von 5-Hydroxytryptamin (5-HT), Adrenalin und Noradrenalin auf Blutdruck, Haut- und Muskeldurchblutung untersucht und verglichen. Der Blutdruck wurde direkt in der A. brachialis, die Skeletmuskeldurchblutung mit der Wärmeleitsonde nach Hensel an Unterarm oder Unterschenkel und der Wärmestrom der Haut (als qualitatives Maß für die Hautdurchblutung) an Unterschenkel oder Hand mit einem Strömungscalorimeter fortlaufend registriert.

5-HT führt i.a. in Dosen von 0,1—100 γ zu einer Mehrdurchblutung des Muskels, welche mit steigender Dosis zunehmend in eine sekundäre Durchblutungsabnahme übergeht. Intravenös sind auf die untersuchten Kreislaufgrößen erst Mengen über 100 γ wirksam; sie haben bis zur hier

geprüften Höchstdosis von 3 mg ebenfalls eine Mehrdurchblutung des Muskels zur Folge.

Die Hautdurchblutung nimmt sowohl bei i.a. wie bei i.v. Gabe wirksamer Mengen von 5-HT ab.

Der Blutdruck sinkt nach größeren i.v. Dosen von 5-HT systolisch und diastolisch kurzfristig ab und steigt in einzelnen Fällen anschließend vorübergehend über den Ausgangswert an.

Die Wirkungen von 5-HT auf Haut- und Muskeldurchblutung sind wahrscheinlich Folge eines peripher-lokalen Angriffs der Substanz.

Die Beziehungen der bekannten Wirkungen des Adrenalins und Noradrenalins auf Haut- und Muskeldurchblutung des Menschen zu den dabei auftretenden Blutdruckänderungen werden erörtert.

Der pressorische Anteil der Blutdruckwirkung von 5-HT wird in gleicher Weise wie der von Adrenalin und Noradrenalin durch Regitin aufgehoben oder abgeschwächt, der depressorische Anteil verstärkt, ohne daß die Reaktionen an Haut- und Muskeldurchblutung nachweisbar verändert werden.

Die Beziehungen der erhobenen eigenen und fremder Befunde zu den Kreislaufveränderungen beim metastasierenden Carcinoid werden erörtert. Das hierbei auftretende Symptom des sogenannten „flushing" ist wahrscheinlich die Folge einer Stase in den Capillaren der Haut.

Literatur

Balzer, H., u. P. Holtz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 547 (1956). — Barcroft, H., and H. J. Swan: Sympathetic Control of Human Blood Vessels. London 1953. — Bernsmeier, A., u. J. Becker: Dtsch. Arch. klin. Med. **200**, 464 (1953). — Bock, K. D., H. Hensel u. J. Ruef: Pflügers Arch. **261**, 322 (1955). — v. Bubnoff: zit. nach E. Schmid u. a. — Cali, G., and G. Lomeo, II. Europ. Cardiologenkongress Stockholm 1956 (Kurzreferat). — Cerletti, A.: A. Carpi u. E. Rothlin: Helvet. physiol. Acta **13**, C 8/9 (1955). — Comroe, J. H. jr., B. van Lingen, R. C. Stroud and A. Roncoroni: Amer. J. Physiol. **173**, 379 (1953). — Corcoran, A. C., G. M. C. Masson, F. del Greco and I. H. Page: Arch. internat. Pharmacodynamie **97**, 483 (1954). — Dittmar, H. A., K. Mechelke u. E. Nusser: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 89 (1954). — Erspamer, V.: Pharmacol. Rev. **6**, 425 (1954). — Feyrter, F.: Dtsch. med. Wschr. **1956**, 1073. — Fleckenstein, A., u. D. Stöckle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 401 (1955). — Gaddum, J. H., C. O. Hebb, A. Silver and A. A. B. Shaw: Quart. J. Exper. Physiol. **38**, 255 (1953). — Ginzel, K. H., and S. R. Kottegoda: Quart. J. Exper. Physiol. **38**, 225 (1953). — J. of Physiol. **123**, 277 (1954). — Golenhofen, K., H. Hensel u. J. Ruef: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 269 (1955). — Gottstein, U., H. Hille u. A. Oberdorf: Pflügers Arch. **261**, 78 (1955). — Gottstein, U., u. H. Hille: Z. Kreislaufforsch. **44**, 433 (1955). — Gross, F., J. Tripod u. R. Meier: Schweiz. med. Wschr. **1951**, 352. — Heinzel, F., K. Matthes, K. Mechelke u. E. Nusser: Cardiologia (Basel) XXI, 743 (1952). — Hensel, H.: Z. exper. Med. **117**, 587 (1951). — Z. Kreislaufforsch. **41**, 251 (1952). — Ber. Physiol. **162**, 360 (1954). — Hensel, H., u. K. D. Bock: Pflügers Arch. **260**, 361 (1955). — Hensel, H., u. J. Ruef: Pflügers Arch. **259**, 267 (1954). — Humphrey, J. H., and C. C. Toh: J. of Physiol. **124**, 300 (1954). — Kottegoda, S. R.,

and J. C. Mott: Brit. J. Pharmacol. **10**, 66 (1955). — Langemann, H.: zit. nach A. Sjoerdsma u. a. — Schweiz. med. Wschr. **1955**, 957. — Lembeck, F.: Nature (Lond.) **172**, 910 (1953). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 50 (1954). — Matthes, K.: Kreislaufuntersuchungen am Menschen mit fortlaufend registrierenden Methoden. Stuttgart 1951. — McCannon, D. M., and St. M. Horvath: Amer. J. Physiol. **179**, 131 (1954). — Page, I. H.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **105**, 58 (1952). — Page, I. H., and I. W. McCubbin: Circulation Research **1**, 354 (1953). — Pernow, B., and J. Waldenström: Lancet **267**, 951 (1954); zit. nach A. Sjoerdsma u. a. — Ratzenhofer, M., u. F. Lembeck: Z. Krebsforsch. **60**, 169 (1954). — Reid, G.: J. of Physiol. **118**, 435 (1952). — Reid, G., and M. Rand: Austral. J. Exper. Biol. a. Med. Sci. **29**, 401 (1952). — Roddie, I. C., J. T. Shepherd and R. F. Whelan: Brit. J. Pharmacol. **10**, 445 (1955). — Schaefer, H.: Acta neurovegetativa (Wien) **IV**, 201 (1952). — Schmid, E., H. Weltz u. G. Freund: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 307 (1956). — Sjoerdsma, A., H. Weissbach and S. Udenfriend: Amer. J. Med. **20**, 520 (1956).

Anschrift der Verf.: Heidelberg, Med. Universitätsklinik, Bergheimer Str. 58

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 274—283 (1957)

Aus den Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel

Der Einfluß der Nebennieren auf die blutdrucksteigernde Wirkung von Renin und auf pressorische Substanzen in den Nieren*

Von
F. Gross und F. Sulser

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Dezember 1956)

Entfernung der Nebennieren führt an der Ratte und am Hund zu einer Abschwächung der blutdrucksteigernden Wirkung von injiziertem Renin, die sich 2—3 Tage nach Adrenalektomie deutlich nachweisen läßt (Williams u. a., 1939, Friedman u. a., 1940, Salmoiraghi u. McCubbin, 1954). Durch doppelseitige Nierenexstirpation wird die pressorische Wirkung von Renin am nebennierenlosen Tier wieder hergestellt und meist sogar verstärkt. Unter der Voraussetzung, daß Renin aus dem Protein Hypertensinogen das pressorisch wirkende Peptid Hypertensin auf enzymatischem Wege freisetzt, wurde vermutet, daß der nach Adrenalektomie abgeschwächte drucksteigernde Effekt von Renin auf eine Erschöpfung des Reninsubstrates (Hypertensinogen) durch endogen gebildetes Renin zurückzuführen sei (Salmoiraghi u. McCubbin). Für diese Annahme spricht auch der Befund, daß am nebennierenlosen Hund die pressorische Wirkung von Hypertensin gleich ist wie am intakten Tier. Entsprechend dieser Auffassung wird andererseits die verstärkte pressorische Wirkung von Renin am nierenlosen Tier durch eine Zunahme von Hypertensinogen erklärt. In eigenen Untersuchungen fanden wir, daß nicht nur Entfernung der Nieren, sondern auch Überdosierung mit Cortexon und Kochsalz zu einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber Renin oder frisch hergestelltem wäßrigem Nierenextrakt führt und daß der Gehalt der Nieren an pressorisch wirkenden Substanzen von entscheidender Bedeutung für das Ausmaß der durch Renin oder Nierenextrakt hervorgerufenen Drucksteigerung ist (Gross u. Sulser). Auf Grund dieser Befunde war zu vermuten, daß auch die Abschwächung der pressorischen Wirkung von Renin nach Nebennierenentfernung nicht auf Änderungen im Hypertensinogengehalt des Plasmas zurückzuführen ist.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, weitere Einblicke in die Zusammenhänge zwischen Nebennierenfunktion und Gehalt der Nieren

* Herrn Professor Dr. Rolf Meier zum 60. Geburtstag gewidmet.

an pressorischen Substanzen zu gewinnen und die Ursachen der abgeschwächten Reninreaktion am nebennierenlosen Tier abzuklären. Dazu wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt:

1. Vergleich der pressorischen Wirkung von Renin und Hypertensin an der intakten und an der nebennierenlosen Ratte,

2. Bestimmung des Gehaltes an pressorischen Substanzen in den Nieren intakter und nebennierenloser Tiere,

3. Wiederherstellung der Empfindlichkeit gegenüber Renin am nebennierenlosen Tier.

Methode

1. Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber Renin und Hypertensin. Männliche Ratten von durchschnittlich 250 g Gewicht wurden in Äthernarkose doppelseitig adrenalektomiert. Nach 48—72 Std, d. h. im beginnenden Insuffizienzzustand Prüfung der Blutdruckwirkung einer Standarddosis von Renin (1 mg/kg) und Hypertensin (5 E/kg) in Urethannarkose. Wegen der gesteigerten Empfindlichkeit des nebennierenlosen Tieres gegenüber Hypnotica ist die Urethandosis so niedrig wie möglich zu halten. Im allgemeinen genügen 1,0 –1,2 g/kg s.c., während am intakten Tier üblicherweise 1,4 g kg erforderlich sind. Freilegen der art. carotis communis und Anschließen eines Quecksilbermanometers.

2. Bestimmung des Gehaltes an pressorischen Substanzen in den Nieren. Männliche Ratten von durchschnittlich 200 g Gewicht wurden in Äthernarkose doppelseitig adrenalektomiert und bei Vorliegen deutlicher Insuffizienzsymptome (Apathie, Adynamie) 6—8 Tage später getötet. Anschließend wurden die Nieren sofort in der früher angegebenen Weise extrahiert und am nierenlosen Tier auf Gehalt an pressorischen Substanzen untersucht (Gross u. Sulser [2]).

3. Wiederherstellung der Empfindlichkeit gegenüber Renin durch Nephrektomie. Männlichen Ratten im Gewicht von 200—250 g wurde gleichzeitig mit den Nebennieren die rechte Niere entfernt. 48 Std später wurde die linke Niere herausgenommen und dann nach einem Intervall von mindestens 4 Std in Urethan-Narkose die Blutdruckreaktion auf injiziertes Renin in der oben angegebenen Weise geprüft. Da in früheren Versuchen festgestellt worden war, daß erst 4 Std nach doppelseitiger Nierenentfernung eine deutliche Verstärkung der Reninreaktion nachweisbar ist, ist es notwendig, mit der Bestimmung der Empfindlichkeit auf Renin mindestens so lange zu warten, um eindeutige Resultate zu erhalten. In einzelnen Versuchen wurden gleichzeitig mit den Nebennieren beide Nieren exstirpiert, jedoch vertragen die Tiere nach diesem Eingriff die Urethannarkose und die Reninjektion schlecht. Auch die Tiere, bei denen die zweite Niere erst einige Stunden vor dem Versuch entfernt wird, sind gegenüber Renin und Nierenextrakt sehr empfindlich und häufig treten schon nach der ersten Injektion allgemeine toxische Wirkungen auf, die unter Abfall des vorher gesteigerten Blutdruckes zum Tod des Tieres führen.

Als Renin fand ein Rohpräparat aus Schweinenieren Verwendung, von dem 0,25 mg/kg an der mit Dial narkotisierten Katze bei intravenöser Injektion eine durchschnittliche Blutdrucksteigerung von 35 mm Hg hervorrufen[1]. Als Testdosis wurde 1 mg kg Renin in wäßriger Lösung (0,1 ml) in die vena jugularis injiziert. Hypertensin stand in Form eines weitgehend gereinigten Präparates zur Verfügung,

[1] Wir danken Herrn Dr. B. Kleinberg, Princeton, N.J. für die Überlassung des Präparates.

das 1200—1500 Hunde-Einheiten pro mg enthielt und das in Dosen von 5 E/kg intravenös injiziert wurde[1].

Der Gehalt der Nieren an pressorischen Substanzen wurde an der nierenlosen Ratte in der früher angegebenen Weise testiert (Gross u. Sulser [2]), wobei jeweils 0,1 ml des frisch hergestellten Extraktes in die vena jugularis injiziert wurden. Um den Gehalt der Nierenextrakte an pressorischen Substanzen quantitativ zu erfassen, wurden Verdünnungen der Rohextrakte hergestellt, von denen ebenfalls 0,1 ml als Einzeldosis injiziert wurden.

Resultate

1. Renin-Reaktion am nebennierenlosen Tier. Nach Adrenalektomie ist der Ausgangsblutdruck bei den mit Urethan narkotisierten Tieren etwa gleich wie bei den intakten Kontrolltieren. Die blutdrucksteigernde

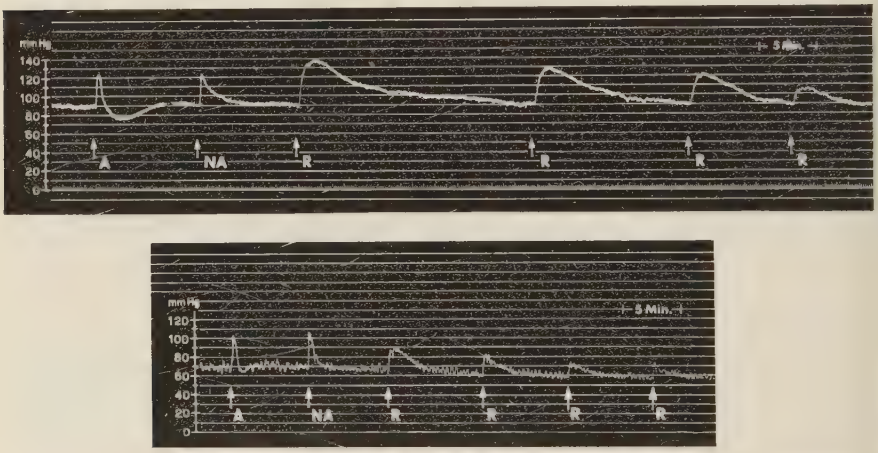


Abb. 1. Ratte, Urethannarkose. Blutdruck in art. carotis communis. A: 0,002 mg/kg Adrenalin; NA: 0,002 mg/kg Nor-Adrenalin; R: 1 mg/kg Renin. Obere Kurve: intaktes Tier. Untere Kurve: nebennierenloses Tier 72 Std nach Operation. Abgeschwächte Butdrucksteigerung nach Renin

Wirkung von Renin und von Nierenextrakten ist dagegen abgeschwächt und verkürzt. Dieser Effekt tritt 48—72 Std nach Adrenalektomie deutlich in Erscheinung und ist schon nach 24 Std angedeutet nachweisbar (Abb. 1). Die Tachyphylaxie ist stärker ausgeprägt als am intakten Tier. Wiederholte Injektionen von Renin können zu Blutdruckabfall führen und den Tod des Tieres zur Folge haben. Im Gegensatz zu der abgeschwächten Reninwirkung ist der Blutdruckanstieg nach Injektion von Hypertensin etwa gleich wie beim intakten Tier. Dasselbe ist der Fall für Adrenalin und Nor-Adrenalin, die beim adrenalektomierten Tier sogar eine leicht verstärkte, allerdings nicht verlängerte Drucksteigerung hervorrufen. Es liegt somit beim nebennierenlosen Tier

[1] Wir danken Herrn Dr. H. Schwarz, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio, für die Überlassung des Präparates.

Tabelle 1. *Stärke und Dauer der Blutdrucksteigerung nach intravenöser Injektion von Renin, Adrenalin und nor-Adrenalin am intakten, adrenalektomierten, nephrektomierten, sowie am adrenalektomierten und nephrektomierten Tier.* (Mittelwerte aus je 10 Versuchen)

	Ausgangsdruck in mm Hg	Adrenalin (0,002 mg/kg) max. Druckanstieg mm Hg	Nor-Adrenalin (0,002 mg/kg) max. Druckanstieg mm H	Renin (1 mg/kg) max. Druck anstieg mm Hg	Renin (1 mg/kg) Dauer des Druckanstieges/min	Renin (1 mg/kg) Integral der Blutdruckkurve (Planimeter) in cm²
Intaktes Tier	75 ± 13	38 ± 13	25 ± 6	43 ± 8	11 ± 3	6 ± 3
Adrenalektomiertes Tier. . .	76 ± 7	35 ± 9	29 ± 9	19 ± 6	5 ± 1	2,2 ± 0,5
Nephrektomiertes Tier . . .	67 ± 20	47 ± 8	44 ± 11	90 ± 12	> 15	> 31
Adrenalektomiertes und nephrektomiertes Tier . . .	65 ± 19	51 ± 12	39 ± 13	73 ± 7	> 15	> 26
Injektion v. Nierenextrakt beim adrenalektomierten u. nephrektomierten Tier . . .	64 ± 18			43 ± 10	10 ± 3	6,5 ± 3

keine allgemeine Verminderung der Ansprechbarkeit des Gefäßsystems gegenüber blutdrucksteigernden Substanzen vor, sondern nur eine isolierte Abnahme der pressorischen Wirkung von Renin (Tab. 1).

2. Gehalt der Nieren an pressorischen Substanzen. Bei Tieren mit ausgesprochenen Insuffizienzsymptomen 6—8 Tage nach Adrenalektomie ist der Gehalt an pressorischen Wirkstoffen in den Nierenextrakten erhöht. Dies kommt bei Prüfung des unverdünnten Nierenextraktes, der in einer Menge von 0,1 ml meist zu einer maximalen Drucksteigerung am nierenlosen Tier führt, nicht deutlich zum Ausdruck, ist jedoch bei Verdünnungen des Extraktes auf 1:50 oder 1:100 eindeutig nachweisbar (Abb. 2).

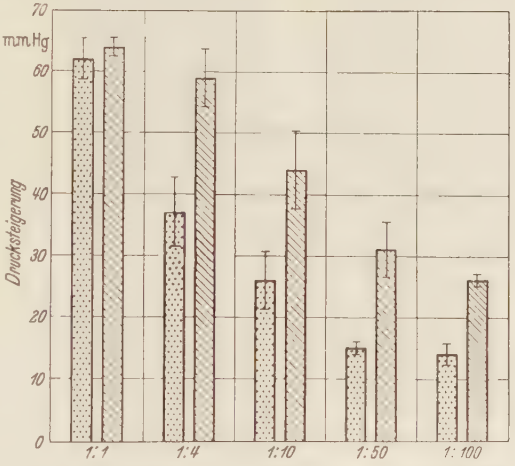


Abb. 2. Blutdrucksteigernde Wirkung verschiedener Verdünnungen von Nierenextrakten von intakten Tieren (▨) und von nebennierenlosen Tieren (▧). (Mittelwerte von je 6—10 Tieren)

Behandelt man die nebennierenlosen Tiere mit Erhaltungsdosen von Cortexon (0,1 mg/kg täglich in öliger Lösung) und gibt gleichzeitig

Futter mit einem Kochsalzgehalt von 0,7%, so ist keine eindeutige Vermehrung von pressorischen Substanzen in den Nieren festzustellen. Mit der verwendeten, verhältnismäßig ungenauen biologischen Bestimmungsmethode ist somit nur bei Vorliegen eines Insuffizienzzustandes eine Zunahme von drucksteigernden Stoffen nachzuweisen, dagegen nicht, wenn die Tiere durch Behandlung mit Cortexon kompensiert sind und die Natriumbilanz ausgeglichen ist. Es ist anzunehmen, daß die erhöhte pressorische Wirkung von Extrakten aus Nieren adrenalektomierter Tiere auf eine Zunahme des Gehaltes an blutdrucksteigernd wirkenden Substanzen (Renin?) zurückzuführen ist. Dabei ist nicht zu entscheiden, ob es sich um eine Mehrproduktion oder eine Speicherung infolge verminderter Abgabe handelt und ob sich die Extrakte nur quantitativ von den aus Nieren intakter Tiere hergestellten unterscheiden oder ob sie auch eine andere Zusammensetzung aufweisen.

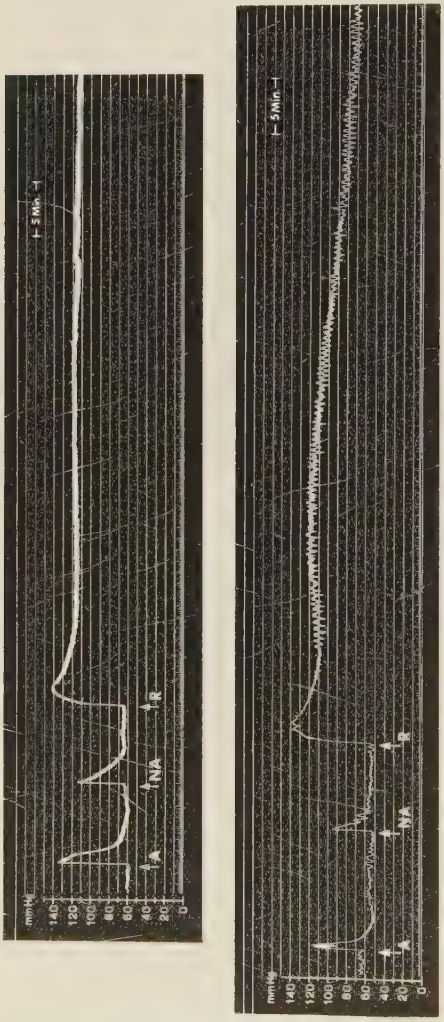


Abb. 3. Ratte. Urethannarkose. Blutdruck in art. carotis communis. A: 0,002 mg/kg Adrenalin; NA: 0,002 mg/kg Noradrenalin; R: 1 mg/kg Renin. Obere Kurve: nierenloses Tier. Untere Kurve: nebennierenloses und nierenloses Tier. Die blutdrucksteigernde Wirkung von Renin ist nach Nierenentfernung auch am nebennierenlosen Tier verstärkt und verlängert

3. Wiederherstellung der Renin-Reaktion am nebennierenlosen Tier. Entfernt man am nebennierenlosen, unilateral nephrektomierten Tier die zweite Niere, so wird die drucksteigernde Wirkung von Renin wesentlich verstärkt und verlängert, wobei allerdings der Blutdruck nicht so lange auf dem erhöhten Niveau bleibt wie beim nephrektomierten Tier in Anwesenheit der Nebennieren (Abb. 3). Der Druck fällt vielmehr nach 20—30 min langsam ab, gelegentlich bis

unter den Ausgangswert, und nachfolgende Injektionen von Renin führen nicht mehr zu einer gleich verstärkten und verlängerten Reaktion wie die erste Injektion nach Entfernung der Nieren.

Um abzuklären, ob die Anwesenheit der intakten Niere für die abgeschwächte Renin-Reaktion beim nebennierenlosen Tier verantwortlich ist, erhielten adrenalektomierte und gleichzeitig nephrektomierte Tiere 1—2 ml frischen Nierenextrakt oder 1—2 mg Renin intraperitoneal injiziert, was meist zu einem langsamen Blutdruckanstieg um 10 bis 30 mm Hg führt. Wird anschließend Renin i.v. gegeben, so ist die für

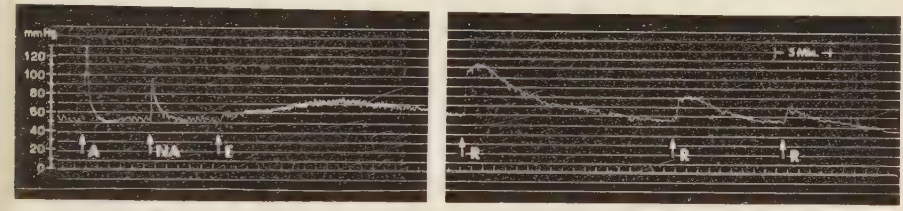


Abb. 4. Nebennierenlose und nierenlose Ratte. Urethannarkose. Blutdruck in art. carotis communis. A: 0,002 mg/kg Adrenalin; NA: 0,002 mg/kg Nor-Adrenalin; E: 2 ml Nierenextrakt intraperitoneal; R: 1 mg/kg Renin (Unterbrechung der Kurve entspricht einer Zeit von 10 min). Durch Vorbehandlung mit Nierenextrakt wird die Verstärkung und Verlängerung der Reninwirkung (Abb. 3) aufgehoben

das nierenlose Tier typische Verstärkung und vor allem die Verlängerung der Blutdrucksteigerung nicht mehr nachweisbar, sondern die Reaktion entspricht etwa derjenigen des intakten Tieres und bei wiederholter Gabe tritt auch eine etwa gleiche Tachyphylaxie auf (Abb. 4). Diese „Normalisierung" der verstärkten Renin-Reaktion am nierenlosen Tier durch intraperitoneale Injektion von Nierenextrakt tritt sowohl am adrenalektomierten Tier als auch bei Anwesenheit der Nebennieren auf. Injektion eines Extraktes aus normalen Nieren führt dabei am nebennierenlosen und gleichzeitig nierenlosen Tier nicht zu einer gleichen Abschwächung der Renin-Reaktion, wie sie am nebennierenlosen Tier bei Anwesenheit der Nieren auftritt. Es bleibt zu untersuchen, ob intraperitoneale Injektion von Extrakten aus Nieren von adrenalektomierten Tieren im Insuffizienzzustand, die vermehrt pressorische Substanzen enthalten, am nierenlosen und gleichzeitig nebennierenlosen Tier eine gleiche Abschwächung der Reaktion auf injiziertes Renin hervorruft, wie sie beim nebennierenlosen Tier in Anwesenheit der Nieren zu beobachten ist.

In früheren Versuchen ließ sich zeigen, daß Nierenextrakte von Ratten mit experimenteller Hypertension infolge Überdosierung von Cortexon und Kochsalz, die frei von pressorischen Substanzen sind, keine Abschwächung der verstärkten Renin-Blutdrucksteigerung beim nierenlosen Tier hervorrufen. Die Aufhebung der verstärkten und

verlängerten Blutdrucksteigerung nach Injektion von Renin oder Nierenextrakt am nierenlosen oder am nierenlosen und gleichzeitig adrenalektomierten Tier gelingt nur mit Nierenextrakten, die pressorische Substanzen enthalten. Das nierenlose und gleichzeitig nebennierenlose Tier zeigt somit nach intraperitonealer Injektion von Nierenextrakt ein ähnliches Verhalten wie das nierenlose Tier [Gross u. Sulser (1)].

Die pressorische Wirkung von Renin läßt sich durch Vorbehandlung der nebennierenlosen Tiere mit Cortexon (3×50 mg/kg innerhalb von 3 Wochen) und Kochsalz in ähnlicher Weise verstärken wie durch Nierenexstirpation. Am nebennierenlosen Tier führt Überdosierung mit Cortexon und Kochsalz während 3—4 Wochen zu einer etwa gleichen Blutdrucksteigerung wie am intakten Tier. Injiziert man den so vorbehandelten nebennierenlosen Tieren nach 3 Wochen Renin in Urethannarkose, so ist die Drucksteigerung im Vergleich zur pressorischen Reaktion am intakten Tier verstärkt und verlängert, jedoch bleibt der Druck nicht so lange auf dem erhöhten Niveau wie nach Entfernung der Nieren.

Bei Überdosierung von Cortexon und Kochsalz nimmt der Gehalt der Nieren an pressorischen Substanzen ab und parallel damit geht eine Verstärkung der Drucksteigerung von injiziertem Renin oder Nierenextrakt [Gross u. Sulser (3)]. Dieser Effekt ist auch am nebennierenlosen Tier nachweisbar. Die abgeschwächte Reaktion des nebennierenlosen Tieres auf Renin kann somit entweder durch Entfernung der endogenen Reninquelle (Nierenexstirpation) oder durch funktionelle Ausschaltung der pressorischen Wirkstoffe (Überdosierung von Cortexon und Kochsalz) in die für das nierenlose oder für das mit Cortexon und Kochsalz überdosierte Tier typische Verstärkung umgewandelt werden. Beim nebennierenlosen Tier führen somit die gleichen Maßnahmen zu einer Verstärkung und Verlängerung der Reninreaktion wie bei Anwesenheit der Nebennieren.

Besprechung der Ergebnisse

Die bereits von anderen Autoren (Williams u. a., Salmoiraghi u. McCubbin, Friedman u. a.) beobachtete Abschwächung der pressorischen Wirkung von Renin an nebennierenlosen Tieren (Ratte, Hund) ließ sich unter unseren Versuchsbedingungen ebenfalls nachweisen, wobei nicht nur die primäre Blutdrucksteigerung vermindert ist, sondern auch eine gesteigerte Tachyphylaxie auftritt. Als wesentlicher neuer Befund ergibt sich, daß in den Nieren adrenalektomierter Ratten im Insuffizienzzustand die pressorisch wirksamen Substanzen vermehrt sind. In früheren Untersuchungen wurde bereits gezeigt, daß nach Adrenalektomie bei Katzen (Friedman u. a.) und Hunden (Bessinger u. Wakerlin) Renin in den Nieren nicht vermindert ist und es wurde auch vermutet, jedoch nicht bewiesen, daß die Nieren adrenalektomierter

Ratten mehr Renin enthalten als diejenigen intakter Tiere (Williams u. a.). Es liegt nahe anzunehmen, daß die Zunahme blutdrucksteigernder Substanzen in der Niere verantwortlich für die abgeschwächte Druckreaktion von injiziertem Renin ist und daß andererseits die Abnahme oder das Fehlen derartiger Stoffe in der Niere nach Überdosierung von Cortexon und Kochsalz oder nach Nierenentfernung eine Verstärkung und Verlängerung der Renin-Reaktion zur Folge hat. Intensität und Dauer des Blutdruckanstieges nach Injektion von Renin oder Nierenextrakt verhalten sich somit umgekehrt proportional zu dem Gehalt der Nieren an pressorisch wirkenden Stoffen. Der drucksteigernde Effekt von Hypertensin ist nach Adrenalektomie nicht vermindert, und es ist daher vermutet worden, daß die abgeschwächte Renin-Reaktion auf eine Verminderung des Renin-Substrates zurückzuführen ist (Salmoiraghi u. McCubbin). Die raschen Veränderungen der pressorischen Wirkung von Renin bei Entfernung der Niere und bei Gabe von Nierenextrakt oder von Renin können jedoch kaum auf Schwankungen des Hypertensinogengehaltes und dadurch bedingte Abweichungen der Produktion von Hypertensin zurückzuführen sein. Außerdem spricht dagegen der Befund, daß intraperitoneale Injektion von Nierenextrakt bei nierenlosen und bei gleichzeitig nieren- und nebennierenlosen Tieren zu gleicher Abschwächung der pressorischen Renin-Reaktion führt.

Der Mechanismus, durch den die in den Nieren nachweisbaren pressorischen Substanzen die Wirkung von injiziertem Renin oder Nierenextrakt beeinflussen, ist bisher nicht bekannt. Aus unseren Versuchen über den die Renin-Wirkung am nierenlosen Tier „normalisierenden" Einfluß von injiziertem Nierenextrakt geht hervor, daß dieser Effekt nicht an das Vorhandensein von Nierengewebe gebunden ist, sondern daß der oder die in den Extrakten vorliegenden Wirkstoffe diese Fähigkeit in gleicher oder ähnlicher Weise besitzen wie die intakte Niere. Es kann nur vermutet werden, daß enzymatische Vorgänge hierbei eine wesentliche Rolle spielen, die jedoch wahrscheinlich komplizierter sind als die bekannte Freisetzung von Hypertensin durch Renin. Der Gehalt des Extraktes an Hypertensinase, der eine leichte Abschwächung der Hypertensin-Blutdrucksteigerung zur Folge hat, dürfte für den andersartigen Verlauf der Renin-Reaktion höchstens von untergeordneter Bedeutung sein.

Es liegt nahe, unsere Befunde im Zusammenhang mit den von Hartroft (1953, 1955) in den juxtaglomerulären Zellen der Niere beobachteten morphologischen Veränderungen zu bringen. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß am nebennierenlosen Tier oder bei salzarmer Ernährung die Granula in den juxtaglomerulären Zellen der Niere zunehmen, während sie bei kochsalzreicher Ernährung oder bei Überdosierung von Cortexon und Kochsalz abnehmen oder verschwinden. Dabei kann auf Grund des morphologischen Befundes nicht entschieden werden, ob die Bildung der Granula verändert ist oder ob die Ausschüttung des Materials

beeinflußt wird. Die Nieren des nebenniereninsuffizienten Tieres enthalten viele Granula und die aus ihnen hergestellten Extrakte wirken stark blutdrucksteigernd, während Extrakte aus Nieren, die arm an Granula sind, keine Blutdruckzunahme hervorrufen.

Obwohl bisher nicht nachgewiesen ist, daß die Granula in den juxtaglomerulären Zellen das morphologische Substrat der pressorischen Nierenwirkstoffe darstellen, ist es wahrscheinlich, daß ein Zusammenhang zwischen den Änderungen des Gehaltes der Nieren an blutdrucksteigernden Substanzen und dem verschiedenen Füllungszustand der juxtaglomulären Zellen mit Granula besteht. Dabei spricht die Verstärkung der drucksteigernden Wirkung von Renin oder Nierenextrakt bei Tieren, bei denen infolge Überdosierung von Cortexon und Kochsalz keine pressorischen Substanzen mehr in den Nieren nachweisbar sind, für eine Hemmung oder Erschöpfung der Produktion dieser Stoffe, da bei vermehrter Ausschüttung eine Abschwächung der Renin-Drucksteigerung zu erwarten wäre.

In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich die Beeinflussung der pressorischen Wirkung von Renin und Nierenextrakten auf den Blutdruck untersucht. Diese Stoffe besitzen jedoch noch andere Eigenschaften, die möglicherweise für die Gesamtwirkung von gleicher oder sogar größerer Bedeutung sind als der blutdrucksteigernde Effekt.

Renin fördert die Ausscheidung von Flüssigkeit und von Kochsalz und ruft eine vorübergehende Proteinurie hervor (Pickering u. Prinzmetal; Croxatto u. a., Sellers u. a., Hughes-Jones u. a.). Weiterhin hat Hartroft gezeigt, daß bei Cortexon- und Salzüberdosierung gleichzeitig mit der Abnahme der Granula in den juxtaglomerulären Zellen eine Verschmälerung der zona glomerulosa der Nebennierenrinde auftritt, während bei salzarmer Ernährung die zona glomerulosa Zeichen einer Überfunktion aufweist. Es ist möglich, daß es sich bei dieser morphologisch faßbaren Änderung des Funktionszustandes der Nebennierenrinde und der juxtaglomerulären Zellen um die gleichzeitige Einwirkung eines Faktors auf zwei verschiedene Organe handelt. Es kann aber auch angenommen werden, daß Schwankungen der Natriumkonzentration im Plasma bzw. im Organismus primär die Bildung oder Freisetzung der Nierenwirkstoffe beeinflussen und daß diese ihrerseits auf die Hormonproduktion der Nebennierenrinde, insbesondere der zona glomerulosa, einwirken. Die Zusammenhänge zwischen dem Gehalt der Nierenextrakte an blutdruckwirksamen Substanzen und der Natriumbilanz des Organismus machen es wahrscheinlich, daß die auf Grund ihrer pressorischen Eigenschaften definierten Wirkstoffe der Niere auch eine Bedeutung für die Regulation der Natriumausscheidung besitzen, und es ist möglich, daß hier ähnliche Verhältnisse wie bei Pitressin vorliegen, dessen blutdrucksteigernde Wirkung im Vergleich zur antidiuretischen von untergeordneter Bedeutung sein dürfte.

Summary

1. In the adrenalectomised rat the pressor response to hog renin and to rat kidney extract is definitely diminished, whereas the hypertensive effect of hypertensin, adrenaline or nor-adrenaline is not altered or slightly increased.

2. Extracts prepared from kidneys of adrenalectomised rats with marked adrenal insufficiency contain more pressor active material (renin) than kidney extracts from normal rats.

3. The diminished hypertensive response to renin or kidney extracts in the adrenalectomised rat is changed into an increased pressor reaction of prolonged duration by nephrectomy or overdosage with cortexon and salt.

4. The increased pressor response to renin or kidney extract in the adrenalectomised and simultaneously nephrectomised rat is converted to a normal reaction by the intraperitoneal injection of kidney extract.

5. It is assumed that the interrelationship between the adrenal cortex and the content of pressor active material in the kidney may be of greater importance for the regulation of sodium metabolism thanfor the regulation of blood pressure.

Herrn R. Döbelin danken wir für seine sorgfältige Hilfe bei den Versuchen.

Literatur

Bessinger, H. E., and G. E. Wakerlin: Relation of the adrenal glands to the renin concentration of the canine kidney. Amer. J. Physiol. **155**, 426 (1948). — Croxatto, H., L. Barnafi and J. Passi: Effect of renin on diuresis. Acta Physiol. Latinn. Americana **2**, 159 (1952). — Friedmann, B., E. Somkin and E. T. Oppenheimer: The Relation of Renin to the Adrenal gland. Amer. J. Physiol. **128**, 481 (1940). — Gross, F., u. F. Sulser (1): Verstärkung und Normalisierung der blutdrucksteigernden Wirkung von Renin an der Ratte. Helvet. physiol. Acta **12**, C 75 (1954). — (2): Wirkungsverstärkung von Renin und Nierenextrakt an der nierenlosen Ratte. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 338 (1956). — (3): Pressorische Substanzen in den Nieren experimentell hypertonischer Ratten. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 374 (1956). — Hartroft, Ph. M., and W. St. Hartroft: Studies on renal juxtaglomerular cells. I. Variations produced by sodium chloride and desoxycorticosterone acetate. J. of Exper. Med. **97**, 415 (1953). — Studies on Renal juxtaglomerular cells. II. Correlation of the degree of granulation of juxtaglomerular cells with width of the zona glomerulosa of the adrenal cortex. J. of Exper. Med. **102**, 205 (1955). — Houssay, B. A., and L. Dexter: The Sensitivity to hypertensin, adrenalin and renin of unanesthetized normal adrenalectomized hypophysectomized and nephrectomized dogs. Ann. Int. Med. **17**, 451 (1942). — Hughes-Jones, N. C., G. W. Pickering, P. H. Sanderson, H. Scarborough and J. Vandenbroucke: The nature of the action of renin and hypertensin on renal function in the rabbit. J. of Physiol. **109**, 288 (1949). — Pickering, G. W., and M. Prinzmetal: The effect of renin on urine formation. J. of Physiol. **98**, 314 (1940). — Salmoiraghi, G. C., and J. W. McCubbin: Effect of adrenalectomy on pressor responsiveness to angiotonin and renin. Circulation (New York) **2**, 280 (1954). — Sellers, A. L., St. Smith, H. C. Goodman and Jessi Marmorston: Effects of renin on excretion of sodium, chloride and water in the rat. Amer. J. Physiol. **166**, 619 (1951). — Sellers, A. L., St. Smith, Jessie Marmorston and H. C. Goodman: Studies on the mechanism of experimental. Proteinuria. J. of Exper. Med. **96**, 643 (1952). — Williams, J. R., J. T. Diaz, J. C. Burch and T. R. Harrison: The relation of the adrenal glands to the action of the renal pressor substance. Amer. J. Med. Sci. **198**, 212 (1939).

Dr. F. Gross, Wissenschaftliche Laboratorien der CIBA AG., Basel/Schweiz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 284—300 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Die Beteiligung des Vasopressins an der Entstehung des Ödems*

Von

H. Herken, G. Senft und J. Schaper

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Dezember 1956)

Die Entdeckung des natriumretinierenden Steroids Aldosteron (Deming u. Luetscher 1950, Luetscher, Neher u. Wettstein 1954) hat die Forschung über die hormonalen Ursachen des Ödems so intensiv beschäftigt, daß die viel diskutierten Wirkungen des antidiuretischen Hormones (Vasopressin) an Interesse verloren zu haben scheinen. Nach wie vor wird aber an der bekannten Hypothese festgehalten, die das Zusammenwirken der Hormone aus Nebenniere und Hypophyse bei der Ödementstehung für ursächlich wichtig hält.

Hierbei kommt den von Verney (1947) beschriebenen Osmoreceptoren besondere Bedeutung zu, die bereits auf geringfügige Änderungen des osmotischen Druckes in der Carotis mit einer Ausschüttung von Vasopressin reagieren können. Verney hat aus seinen Experimenten berechnet, daß eine Vermehrung der Blutchloride um 8 mg % bereits zu einer nachweisbaren Mehrabsonderung des Wirkstoffes führen kann, die unter diesen Bedingungen stets eine Wasserretention verursachen soll. Eine solche Erhöhung der Salzkonzentration ist unter dem Einfluß der gesteigerten Produktion von Aldosteron durchaus möglich, so daß theoretisch keine Einwände gegen eine Übertragung dieser Befunde auf die Vorgänge bei der Ödementwicklung bestehen.

Bei einer kritischen Überprüfung der umfangreichen Literatur über die Wirkung des „antidiuretischen" Hormones (Vasopressin) auf den Wasser- und Salzhaushalt des Organismus treten jedoch Zweifel auf, ob die Hypothese über den Synergismus der erwähnten Hormone bei der Ausbildung des Ödems wirklich zutrifft. Unter Berücksichtigung älterer Untersuchungen von Silvette u. Britton (1938) haben Gaunt, Birnie u. Eversole (1949) sowie Gaunt, Lloyd u. Chart (1956) Beweise für das Bestehen eines bemerkenswerten Antagonismus zwischen den Halocortinen der Nebenniere und den Hormonen des Hypophysenhinterlappens beigebracht, der nach Ansicht der Autoren für die Aufrechterhaltung des normalen Salz- und Wasserbestandes im Körper verantwortlich ist. Diese Hypothese stützt sich u. a. auf die nachgewiesene Hemmung der natriuretischen Wirkung von Vasopressin durch Aldosteron (Gaunt u. Mitarb. 1956) und auf die diuretischen Wirkungen der Cortine am adrenalektomierten Tier (Gaunt, Birnie u. Eversole 1949). Gross u. Meier (1951) beobachteten, daß die nach Ausfall

* Prof. Dr. Rolf Meier zum 60. Geburtstag.

der Nebennierenrindenfunktion auftretende Störung des Wasser- und Mineralhaushaltes am besten durch diejenigen Rindenhormone beeinflußt wurde, die eine Wirkung im Überlebenstest besaßen. Gegen die Abhängigkeit der wasserretinierenden Effekte des Vasopressins von der Erhöhung der Salzkonzentration des Blutplasmas und der extracellulären Flüssigkeit wurden Bedenken von Brunner, Kuschinsky u. Peters (1956) erhoben, die „eine Herabsetzung, Aufhebung oder sogar Umkehr der antidiuretischen Vasopressinwirkung mit steigendem Natriumgehalt der Wässerungsflüssigkeit" beobachten konnten. Dieser Vorgang wurde in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen von Sawyer (1952) als Folge der angestiegenen Kochsalzkonzentration in der Körperflüssigkeit gedeutet. Danach sieht es so aus, als ob die Ausschüttung „antidiuretisch" wirksamer Mengen des Hypophysenhinterlappenhormones — wenn überhaupt — nur unter extremen Versuchsbedingungen erreicht wird (Gilman u. Goodman 1937, Lipschitz u. Stockey 1947), die weder zu Beginn noch im Verlauf der Ödemkrankheiten jemals gegeben sind. Die Befunde von Brunner, Kuschinsky u. Peters (1956) stehen aber auch im Widerspruch zu den Beobachtungen von Verney (1948), so daß weitere Untersuchungen über die Aufgabe der Hypophysenhinterlappenhormone bei der Steuerung des Mineralstoffwechsels und Wasserhaushaltes für die Aufklärung der Pathogenese des Ödems von besonderem Interesse sind.

Experimentelle Studien über die Beteiligung der erwähnten Hormone an der Ödementstehung setzen reproduzierbare Veränderungen im Mineral- und Wasserhaushalt der Versuchstiere voraus, deren Symptome den beim Menschen beobachteten Funktionsstörungen weitgehend entsprechen. Bei der Ausarbeitung einer geeigneten Methode gingen wir von der vielfach bestätigten Erfahrung aus, daß latent vorhandene Abweichungen in der hormonalen Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes nach größeren Belastungen mit Salzlösungen kenntlich werden.

Unsere Versuchsanordnung, bei der eine 24stündige orale Dauerinfusion einer physiologischen Salzlösung, die im Milliliter 154 μ val Na und 5,5 μ val K enthielt, zur Aufdeckung der Störungen benutzt wurde, beschrieben wir ausführlich in dieser Zeitschrift (Herken, Senft u. Wilutzky 1956). Sämtliche Bestimmungen von Natrium und Kalium im Urin wurden mit einem Beckman Spektrophotometer mit Multiplier und Flammenphotometerzusatz durchgeführt. Bei der Herstellung von Eichlösungen hielten wir uns an die Vorschriften von Mosher, Boyle, Bird, Jacobson, Batchelor, Iseri u. Myers (1949).

Die Untersuchungen an Ratten ergaben ein auffälliges Nachlassen der Eliminationsfähigkeit für Natrium und Wasser mit zunehmendem Alter, das sich bei den ältesten Tieren im Auftreten starker Ödeme an Kopf und Pfoten sichtbar äußerte. Die Ödembildung begann stets mit einer Natriumretention, der die Speicherung von Wasser in deutlichem Abstand folgte. Danach scheint eine Funktionsstörung der Nebennieren mit vermehrter Ausschüttung von Halocortin für das erste Stadium der Ödembildung verantwortlich zu sein. Mit steigender Natriumretention zeigte sich überdies ein zunehmender Wirkungsverlust einiger Diuretica (Herken, Senft u. Wilutzky 1956), so daß die Ähnlichkeit mit dem Verhalten menschlicher Ödemkrankheiten auch hierin besonders auffallend war (Herken 1955, 1956). Die altersbedingten Störungen gaben Anlaß zu

weiteren Untersuchungen über die Pathogenese des experimentellen Ödems, die zunächst in dem Studium der Folgeerscheinungen nach Nebennierenexstirpation unter den gleichen Versuchsbedingungen bestand. In den früheren Arbeiten hatte es sich als zweckmäßig erwiesen, Tiere verschiedenen Alters in drei Versuchsgruppen aufzuteilen. Die folgenden Versuche beschäftigten sich mit den Tieren der Gruppe A (220 g, $\sigma \pm 15$) und Gruppe C (337 g, $\sigma \pm 19$), deren Verhalten mit dem nebennierenloser Tiere verglichen wurde. Die Epinephrektomie wurde bei den Tieren der Gruppe A in Äthernarkose vorgenommen. Am Operationstag erhielten die Tiere 5 ml/100 g physiologische Kochsalzlösung durch eine Schlundsonde. Bis zur Durchführung der Bilanzanalyse wurde das Trinkwasser durch die physiologische Salzlösung ersetzt, die spontan aufgenommen wurde. Die Versuchstiere der Gruppe A, die im 24 stündigen Infusionsversuch Natrium und Wasser quantitativ eliminierten, reagierten am 4. Tag nach der Nebennierenexstirpation mit stärkster Ödembildung, so daß sich bei dem Vergleich mit den Normaltieren der Gruppe A und den älteren nicht adrenalektomierten Tieren der Gruppe C folgende Unterschiede in den Bilanzen ergaben (Abb. 1).

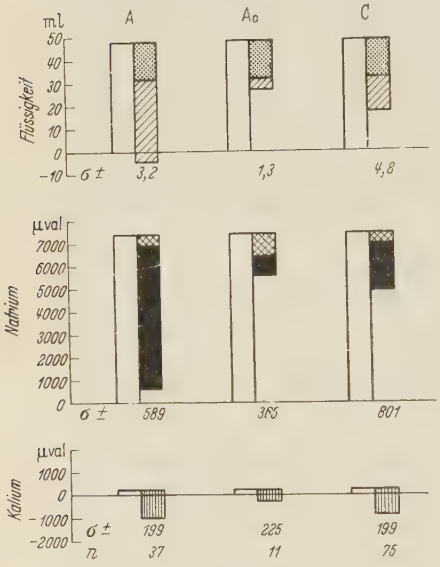


Abb. 1. Wasser-, Natrium- und Kaliumbilanzen bei Ratten der Gruppe A (vor Adrenalektomie) der Gruppe A_0 (nach Adrenalektomie) und der Gruppe C (Halocortintyp des Ödems). ☐ Einfuhr Flüssigkeit, Natrium, Kalium. ▨ Ausfuhr Flüssigkeit. ■ Ausfuhr Natrium. ▥ Ausfuhr Kalium. ▤ Extrarenale Flüssigkeitsverluste. ▩ Natrium Stuhl + Haut

Die nach Adrenalektomie gefundene Verzögerung der Wasserausscheidung stimmt gut mit den Beobachtungen anderer Autoren überein. Die Entstehung dieser Ödeme ist durch Störung des funktionellen Gleichgewichtes zwischen Neurohypophyse und Nebennieren mit nachfolgender vermehrter Ausschüttung des antidiuretischen Hormones erklärt worden. Gegen diese Auslegung wurden verschiedene Einwände vorgebracht, die sich hauptsächlich auf das Fortbestehen der verzögerten Wasserausscheidung nach Hypophysektomie (Kuschinsky u. Mitarb. 1956) oder nach Neurohypophysektomie stützen (Chester Jones 1953). Diese Befunde bilden aber noch kein zwingendes Argument gegen die vorgebrachte Erklärung, weil der Ort der Biosynthese des Vasopressins im Hypothalamus durch die erwähnten Eingriffe nicht getroffen wird. Ganz

abgesehen davon, daß die Störung der Wasserausscheidung nach der Entfernung der Hypophyse andere Ursachen haben kann, hat GAUNT (1956) nachgewiesen, daß die Menge von antidiuretischem Hormon im Hypothalmus und im Blut bereits 1—2 Monate nach der Hypophysektomie wieder ansteigt. Bis zur endgültigen Klärung bestehen daher keine Bedenken, die verzögerte Wasserausscheidung nach Adrenalektomie als kompensatorische Gegenregulation zu deuten, mit deren Hilfe die drohenden Natriumverluste bei Fehlen der Nebennieren durch Wasserretention unter Einsatz des Vasopressins verhindert werden. Wir hatten schon in einer früheren Arbeit diskutiert, daß eine Änderung der glomerulären Filtration zur Erklärung der nach Nebennierenexstirpation beobachteten Störungen nicht ausreicht. (HERKEN, SENFT u. WILUTZKY 1956.) Die Befunde stimmen mit den Beobachtungen von LOTSPEICH (1949) überein, der nachweisen konnte, daß adrenalektomierte Ratten bei ausreichender Zufuhr von Kochsalz normale glomeruläre Filtrationsgrößen aufwiesen.

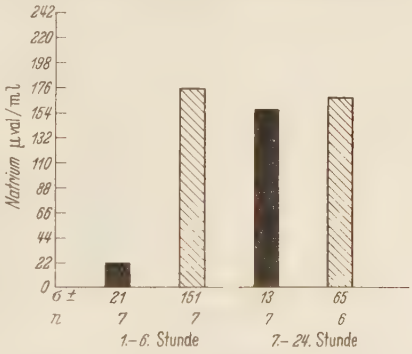


Abb. 2. Natriumkonzentration im Urin von Ratten mit verschiedenen Ödemtypen in der 1. bis 6. und 7. bis 24. Std der oralen Dauerinfusion. ■ Ratten der Gruppe C (Halocortintyp). ▨ Ratten der Gruppe A_0 (Adiuretintyp)

Bei dem Vergleich der Bilanzanalysen aus den Versuchstiergruppen mit Ödemen ist die Feststellung wichtig, daß die Gruppe C mehr Natrium als Wasser retiniert. In der Gruppe A_0 mit entfernten Nebennieren ist das Verhalten umgekehrt. Größere Differenzen in der Natriumausscheidung konnten nicht erwartet werden, da auch bei rindeninsuffizienten Tieren noch 98% des filtrierten Natriums zurückgewonnen werden, so daß maximal nur 2% durch den Harn verlorengehen (PITTS 1951).

Die Unterschiede zwischen den Tiergruppen A_0 und C werden aber noch viel deutlicher, wenn die Natrium- und Wasserausscheidung in den ersten 6 Std der Versuche verglichen wird. Sie lassen erkennen, daß hier tatsächlich zwei verschiedene Ödemarten vorliegen (Abb. 2).

Aus diesem Grunde halten wir es für berechtigt, die nach Adrenalektomie beobachtete Störung des Wasserhaushaltes — unserem früheren Vorschlag entsprechend — als Adiuretintyp des Ödems (A_0) zu bezeichnen, der sich in der Natrium- und Wasserbilanz grundsätzlich vom Halocortintyp der Gruppe C mit erhaltenen Nebennieren unterscheidet (Abb. 3).

Nur bei den Ödemen vom Adiuretintyp fanden wir diuretische Wirkungen verschiedener Cortinoide, so daß unter diesen Bedingungen

die prompte Ausscheidung von Salz und Wasser von der Gegenwart bestimmter Rindenhormone abhängig ist (Herken, Senft u. Wilutzky 1956).

Diese Versuche bestätigen die Beobachtung von Gaunt u. Mitarb. (1949) sowie von Gross u. Meier (1951) auf anderem Wege und sind mit den Vorstellungen über den Antagonismus zwischen den Hormonen der Nebenniere und Hypophyse in Einklang zu bringen. Größere experimentelle Schwierigkeiten bereitet dagegen die Aufklärung der Frage, ob es sich bei dem im Zentralnervensystem synthetisierten Antagonisten tatsächlich um das Vasopressin (Adiuretin) handelt. Es liegen zwar Untersuchungen darüber vor, daß im Blut adrenalektomierter Ratten antidiuretisch wirkende Substanzen in erhöhter Menge vorkommen können. Doch ist dieser Befund vielfach so erklärt worden, daß nebennierenlose Tiere das antidiuretische Hormon langsamer abbauen (Gaunt, Lloyd u. Chart 1956).

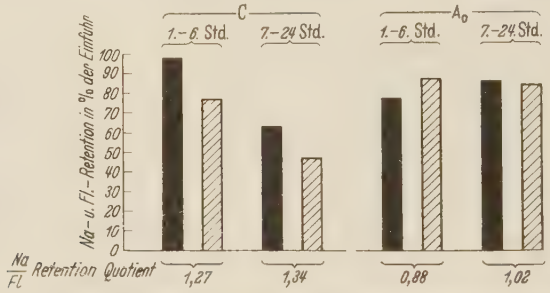
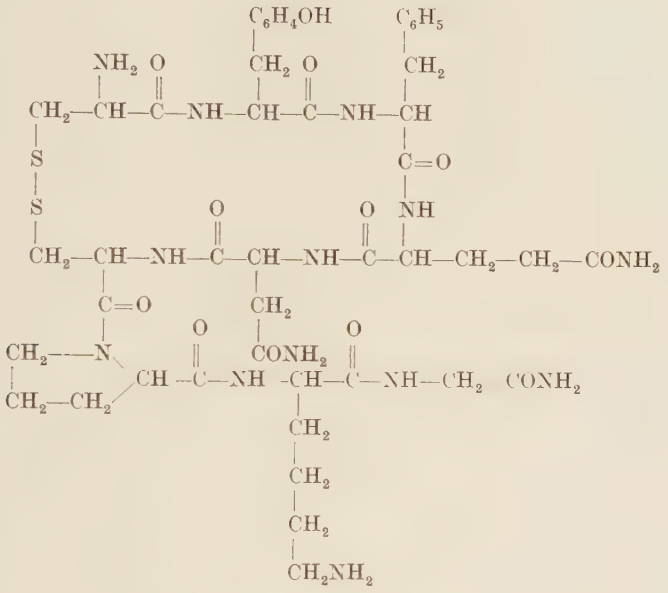


Abb. 3. Natrium- und Wasserretention nach oraler Dauerinfusion einer isotonischen Salzlösung. Überwiegen der Natriumretention bei Ratten der Gruppe C (Halocortintyp). Überwiegen der Wasserretention bei Ratten der Gruppe A_0 (Adiuretintyp) während der ersten 6 Std des Experimentes. ■ Natriumretention in % der Einfuhr. ▨ Wasserretention in % der Einfuhr

Über die Ursachen, die zur Steigerung der Produktion von Aldosteron bei den Ödemkrankheiten führen, ist fast nichts bekannt. Da unsere Versuche den Antagonismus zwischen Nebenniere und Neurohypophyse bestätigen, halten wir es für möglich, daß die Störung des Gleichgewichtes zugunsten der Halocortine mit einer Abnahme der Vasopressinsynthese im Zwischenhirn beginnt. Der Nachweis einer solchen Funktionsstörung ist natürlich von großem Interesse, weil sich daraus neue Gesichtspunkte für die Aufklärung der Pathogenese des Ödems ergeben können. Auffällige Abnahmen der nach Adrenalektomie auftretenden antidiuretischen Gegenregulation hatten wir schon früher bei den ältesten Tieren der Gruppe C beobachtet. Hierbei mußte jedoch die Frage offenbleiben, ob nicht Funktionsstörungen im Tubulusepithel der Niere wesentlichen Anteil an dem Ausfall der Reaktion haben. Vor der weiteren Untersuchung dieser Frage mit Hilfe von Bilanzanalysen an adrenalektomierten Tieren verschiedenen Alters war es daher notwendig, die Wirkungen von reinem Vasopressin unter verschiedenen Bedingungen festzulegen, für dessen Überlassung wir Dr. V. du Vigneaud zu besonderem Dank verpflichtet sind.

Es handelt sich um synthetisches Lysin-Vasopressin, das nach den Untersuchungen von du Vigneaud, Ressler, Swan, Roberts, Katsoyannis u. Gordon (1953) folgende Struktur hat (siehe nachstehende Formel).



Lysin-Vasopressin (Schwein)
Im Oxytocin statt Phenylalanin Isoleucin, statt Lysin Leucin

Bei den oralen Dauerinfusionsversuchen mit physiologischen Salzlösungen an der Ratte hatte sich gezeigt, daß nach quantitativer Resorption von Natrium und Wasser aus dem Darm bei allen Versuchstiergruppen zunächst eine bestimmte Menge Natrium bei wechselnder Flüssigkeitsausscheidung retiniert wird. Die primäre Natriumretention muß zwangsläufig auch zu einer Erhöhung der extracellulären Natriumkonzentration führen, wenn bei der Infusion einer physiologischen Salzlösung nicht äquivalente Mengen Wasser zurückgehalten werden. Bei den Tieren der Gruppe A folgt diesem Vorgang aber eine Periode überschießender Wasserabgabe in den nächsten Stunden des Versuches. Dieser Befund ist sehr schwer zu erklären, wenn man den bisher postulierten Synergismus zwischen Nebennierenrinden- und Hypophysenhormonen gelten läßt. Aus diesem Grunde war es wichtig, die Wirkung des reinen Lysin-Vasopressins nach 24stündiger Dauerinfusion von dest. Wasser sowie 0,9 und 1,8%iger Kochsalzlösung zu prüfen, wobei zum Vergleich

Tabelle 1. *24stündige orale Dauerinfusion*

	Flüssigkeit/ml			Natrium/μval		
	Aqua dest.	0,9% NaCl	1,8% NaCl	Aqua dest.	0,9% NaCl	1,8% NaCl
Gesamteinfuhr	48,0	48,0	48,0	0	7392	14784
Extrarenaler Flüssigkeitsverlust	17,5	17,5	17,5	—	—	—
Einfuhr nach Abzug d. extrarenalen Flüssigkeitsverl.	30,5	30,5	30,5	—	—	—
Versuchszahl	15	19	17	15	10	17
Arithmet. Mittel der Harnausscheidg.	37,8	35,9	39,7	79	5335	12669
Standardabweichung ($\sigma \pm$)	$\pm$ 6,0	$\pm$ 3,2	$\pm$ 3,3	$\pm$ 44	$\pm$ 589	$\pm$ 1091

1. Std der angeschlossenen 5stündigen Testperiode

	Kontrolle			100 ME Vasopressin			100 ME Oxytocin		
	Aqua dest.	0,9%	1,8 %	Aqua dest.	0,9%	1,8%	Aqua dest.	0,9%	1,8%
Harnausscheidung ml/Std	6,2 $\pm$ 0,8	3,1 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,8	2,3 $\pm$ 1,0 p = 0,0002	3,4 $\pm$ 0,8	5,8 $\pm$ 0,84 p = 0,0005	6,3 $\pm$ 1,55	5,7 $\pm$ 0,76	5,9 $\pm$ 0,8 p = 0,0005
Natrium μ val/ml	3,9 $\pm$ 2,8	154,9 $\pm$ 17,6	323,9 $\pm$ 12,2	85,33 $\pm$ 33 p = 0,001	238,6 $\pm$ 16,0 p = 0,0002	311,1 $\pm$ 10,0	2,05 $\pm$ 0,9	157,7 $\pm$ 9,0	317,6 $\pm$ 10,0
Natrium μ val	23,83 $\pm$ 17,5	497,20 $\pm$ 91	1076,42 $\pm$ 191	175,2 $\pm$ 44,2 p = 0,0002	795,3 $\pm$ 147 p = 0,005	1811,3 $\pm$ 233 p = 0,0002	8,54 $\pm$ 5,5	901,26 $\pm$ 189	1882,64 $\pm$ 261 p = 0,0002
Zahl der Versuche	6	5	5	5	5	5	4	5	5

Wirkung von Lysin-Vasopressin während einer 5stündigen Testperiode nach oraler Dauerinfusion mit Aqua dest., 0,9 und 1,8%iger Kochsalzlösung (Methode H. Herken, G. Senft u. H. Wilutzky)

entsprechende Versuche mit der Methode von Brunner, Kuschinsky u. Peters (1956) durchgeführt wurden. Neben dem synthetischen Vasopressin wurde das internationale London-Standard-Präparat und auch synthetisches Oxytocin geprüft, das uns ebenfalls von Dr. V. du Vigneaud überlassen wurde.

Im Anschluß an die 24stündige Dauerinfusion von dest. Wasser und Salzlösungen erhielten männliche Ratten innerhalb von 2 min 5 ml der Infusionsflüssigkeit durch den bereits im Magen liegenden Katheter. Unter Beibehaltung der Dauerinfusion von 2 ml/Std wurden Vasopressin oder Oxytocin 20 min vor der zusätzlichen Flüssigkeitsgabe subcutan injiziert. Die ausgeschiedenen Harnmengen wurden kontinuierlich gesammelt und in stündlichem Abstand analysiert (Versuchsergebnisse in Tab. 1).

In den zum Vergleich angestellten Versuchen hielten wir uns an die Angaben von Brunner, Kuschinsky u. Peters (1956). Weibliche Ratten erhielten 10 und 8 ml dest. Wasser bzw. 7 und 5 ml 0,9 oder 1,8%iger Salzlösung im Abstand von 10 min. Eine geringfügige Abweichung von der Originalmethode bestand darin, daß wir nicht 1, sondern je 4 Versuchstiere benutzten. 60 min nach der ersten Flüssigkeitsgabe wurden Vasopressin oder Oxytocin subcutan injiziert. Im Abstand von 10 min wurde die Harnausscheidung über einen Zeitraum von 90 min verfolgt und in der gesamten Menge Natrium und Kalium mit dem Flammenphotometer bestimmt. Das Maximum des pharmakologischen Effektes wurde in dem Zeitraum zwischen der 20. bis 50. min nach der Injektion erreicht. Aus diesem Grunde sind auch diese Werte registriert (Versuchsergebnisse in Tab. 2).

Die mit beiden Methoden gewonnenen Resultate bestätigen die Befunde von Brunner, Kuschinsky u. Peters (1956). Die von uns beobachtete geringfügige Abweichung in der Natriumkonzentration des Harnes beruht auf Verdunstungserscheinungen, die bei gleichzeitiger Verwendung von 4 Tieren in einer Gruppe nicht zu vermeiden sind. Diese Differenz ist für die Beurteilung der Versuchsergebnisse unwesentlich.

Nur bei Zufuhr von dest. Wasser lassen sich nach Injektion von 100 ME Vasopressin deutliche Wasserretentionen bis zu 40% der Kontrollwerte feststellen. Die Natriumausscheidung wurde dagegen stets gesteigert und erreichte nach Applikation von 100 ME des synthetischen Präparates eine Mehrausscheidung von etwa 270 μ val Natrium gegenüber den Kontrollen. Diesem Befund entsprechend erhöhte sich auch die Natriumkonzentration von 6 μ val/ml bei den Kontrollen auf 141 μ val Natrium pro ml. Oxytocin hatte bis zu einer Dosis von 100 ME im Vergleich zu den Kontrollen keinen Effekt auf die Natriumausscheidung. Die von Brunner, Kuschinsky u. Peters (1956) nach Anwendung von Orasthin beobachtete Erhöhung der Natriumkonzentration, die schon

Tabelle 2. *Testung von synthetischem Lysin-Vasopressin und Oxytocin nach der Methode von* Brunner, Kuschinsky u. Peters

Harnausscheidung	Kontrollen			Vasopressin						London Standard	Oxytocin		
							100 ME				100 ME		
	Aqua dest.	0,9% NaCl	1,8% NaCl	5 ME Aqua dest.	10 ME Aqua dest.	30 ME Aqua dest.	Aqua dest.	0,9% NaCl	1,8% NaCl	10 ME Aqua dest.	Aqua dest.	0,9% NaCl	1,8% NaCl
Flüssigk. in ml/Std/ Ratte 20—50 min nach der Injektion	5,07	1,58	1,83	1,15	1,02	1,7	1,75	3,15	3,1	0,77	4,45	3,1	3,6
$\sigma \pm$	1,11	0,25	1,0	0,3	0,42	0,6	0,57	0,83	0,5	0,5	1,18	0,45	0,1
p				0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,01	0,1	0,0002	0,4	0,01	0,0002
Flüssigkeit in ml/ Ratte 90 min n. d. Injektion	5,79	2,3	2,75	2,7	2,6	2,12	2,17	3,24	4,0	2,5	4,45	3,94	4,33
$\sigma \pm$	1,33	0,1	0,4	1,02	0,42	0,43	0,7	0,57	0,8	0,7	1,18	0,7	0,5
p				0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0027	0,05	0,0002	0,1	0,01	0,05
Natriumkonzentration μ val/ml	6,2	169,7	288,0	17,4	50,9	106,0	141,0	241,15	319,5	41,0	13,14	180,0	307,4
$\sigma \pm$	3,7	20,9	22,0	4,2	27,92	38,5	20,4	25,3	22,7	17,3	12,54	22,0	22,1
p				0,001	0,01	0,0027	0,0002	0,01	0,1	0,005	0,4	0,5	0,4
Natriumausscheidung in μ val	34,2	387,0	826,4	36,64	118,2	200,4	307,5	815,11	1292,0	100,2	76,86	710,74	1356,1
$\sigma \pm$	17,0	64,0	95,0	12,2	42,0	33,0	65,0	48,3	64,0	41,5	58,0	113,5	232,0
p				0,3	0,0027	0,0002	0,0002	0,0002	0,001	0,05	0,2	0,0027	0,01
Anzahl der Versuchsgruppen	10	4	3	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4

von den Autoren als Folge einer Verunreinigung des Handelspräparates mit Vasopressin richtig gedeutet wurde, war bei unseren Versuchen mit dem synthetischen Oxytocin nicht zu beobachten.

Bei Infusion einer 0,9%igen Kochsalzlösung wurde die Wasserausscheidung durch Vasopressin nicht mehr behindert, aber auch nicht wesentlich verstärkt. Unter Fortfall der antidiuretischen Wirkung war die Erhöhung der Natriumausscheidung dagegen nach wie vor deutlich. Sie äußerte sich in einem Anstieg der Natriumkonzentration von 170 μ val (Tab. 2) bzw. 155 μ val (Tab. 1) auf 241 μ val/ml (Tab. 2) bzw. 239 μ val (Tab. 1) nach Einwirkung von 100 ME Vasopressin. Im Gegensatz dazu steigerten 100 ME Oxytocin die Natrium- und Wasserausscheidung ohne Erhöhung der Natriumkonzentration. Darin besteht ein klarer Unterschied zu der Wirkung des Vasopressins. Bei den Experimenten mit 1,8%iger Kochsalzlösung wird durch Vasopressin sowohl die Wasser- als auch die Natriumausscheidung erhöht. Eine Steigerung der Natriumkonzentration im Harn ist nicht mehr festzustellen. Die Annäherung der Wirkung von Oxytocin und Vasopressin war unter diesen Versuchsbedingungen auffallend.

Beide Versuchsreihen zeigen eindeutig, daß nur das Vasopressin die Natriumkonzentration des Harnes in einem Umfang steigern kann, der über die Konzentration der Infusionsflüssigkeit hinausgeht. Erst bei Verwendung der hypertonischen Infusionsflüssigkeit scheint die Grenze der Leistungsfähigkeit des Vasopressins für diesen Vorgang erreicht. Bei den oralen Infusionsversuchen ist das Ergebnis zu beachten, daß die Versuchstiere der Gruppe A, die mit der 24stündigen Zufuhr der 1,8%igen Salzlösung verbundenen großen Natriummengen quantitativ ohne Ödembildung eliminieren können.

Nachdem wir uns durch Bilanzanalysen davon überzeugt hatten, daß auch in dem 24stündigen Versuch Natrium und Wasser vom Darm aus nahezu quantitativ resorbiert und die Natriumionen nach vorübergehender Retention ebenso wie das Wasser vollständig durch den Harn ausgeschieden werden, läßt sich aus den Versuchsergebnissen der Tab. 1 und 2 der Schluß ziehen, daß eine Ausschüttung von Vasopressin unter dem Einfluß der erhöhten Salzkonzentration im Blutplasma oder der extracellulären Flüssigkeit keine antidiuretischen Folgen haben kann. Die der Natriumretention nach einigen Stunden folgende Mehrausscheidung von Wasser, die in unseren früheren Experimenten stets von einer Erhöhung der Natriumkonzentration des Harnes begleitet war, wird sehr wahrscheinlich ihre Ursache in der „diuretischen" Wirkung des Vasopressins haben, die sich in das bisher geltende Schema des Synergismus zwischen Aldosteron und dem Vasopressin bei der Ödementstehung nicht einordnen läßt. Wir haben diese Befunde durch Untersuchungen an Tieren mit experimentellen Ödemen ergänzt und erweitert.

Die orale Infusion einer isotonischen Salzlösung führt bei den Tieren der Gruppe B (Gewicht 275 g, $\sigma \pm 13$) in den ersten 6 Std zu einer Retention von 1795 μ val Natrium, hinter der die Speicherung des Wassers bei weitem zurücksteht, wie sich aus den niedrigen Natriumkonzentrationen des Harnes erkennen läßt. In diesem Stadium der Ödementwicklung bewirkt die Injektion von 100 ME Vasopressin, 4 Std nach Beginn der oralen Infusion verabreicht, eine gesicherte Mehrausscheidung von Natrium, in geringem Umfang auch von Wasser. Dabei erhöht

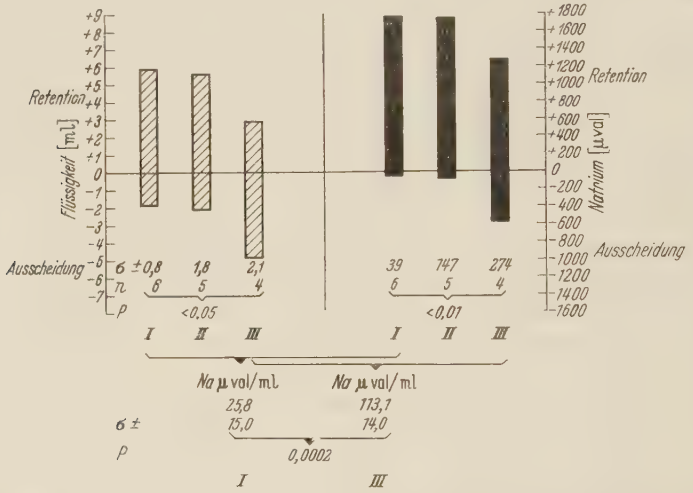


Abb. 4. „Diuretische" Wirkung von 100 ME Vasopressin, 4 Std nach oraler Dauerinfusion injiziert. *I* Kontrollen. *II* 100 ME Vasopressin bei Versuchsbeginn injiziert. *III* 100 ME Vasopressin nach 4stündiger oraler Infusion injiziert. ▨ Flüssigkeit, ■ Natrium

sich die Natriumkonzentration im Harn von 25,8 auf 113,1 μ val/ml für die gesamte 6-Stundenperiode. Daraus läßt sich berechnen, daß die unmittelbar nach der Vasopressin-Injektion eintretende Erhöhung der Natriumkonzentration in der 4. bis 6. Std des Versuches 173 μ val/ml Natrium betragen muß. Sie übersteigt damit die Konzentration der Infusionsflüssigkeit um 19 μ val/ml. Dieser Vorgang findet eine auffallende Parallele in der früher festgestellten spontanen Natriumausscheidung mit Erhöhung der Natriumkonzentration des Harnes nach den ersten 6 Std des Experimentes bei den Versuchstieren der Gruppe A. Offensichtlich ist die Erhöhung der Natriumkonzentration im Blutplasma oder der extracellulären Flüssigkeit für das Zustandekommen der diuretischen Wirkungen von Vasopressin ursächlich wichtig, da die Injektion der gleichen Dosis zu Beginn des Versuches die Natriumretention in dem ersten Stadium der Ödementwicklung nicht verhindern kann (Abb. 4).

Nach diesen Beobachtungen waren weitere Untersuchungen über die Wirkungen beider im Zentralnervensystem synthetisierter Hormone an Tieren mit Ödemen nach Abschluß der 24stündigen Dauerinfusion theoretisch wichtig und im Hinblick auf die Erfahrungen, die wir bei der Anwendung einiger Diuretica gemacht haben, auch klinisch interessant (Herken, Senft, u. Wilutzky 1956, Herken 1956). Diese Versuche führten zu der Feststellung, daß hier nur das Oxytocin diuretisch wirkt (Fraser 1937, 1942, Kuschinsky u. Bundschuh 1939), wobei sich die negativen Bilanzen durch Ausschwemmung der vorher retinierten Ödemflüssigkeit erklären (Abb. 5). Folgende Überlegungen sprechen dafür, daß die Wirkungsbedingungen für Vasopressin in diesem Stadium des Ödems offensichtlich sehr ungünstig sind. Bei der Untersuchung der Natriumkonzentration des Serums dieser Tiere, die nach der 24stündigen Dauerinfusion im Mittel 5257 μ val Natrium und 19,7 ml Flüssigkeit retiniert hatten und auch äußerlich erkennbare Ödeme zeigten, wurden mit 143,5 μ val/ml, $\sigma \pm 4{,}1$ (n = 8) normale Werte gefunden. Unter Berücksichtigung der ermittelten Natrium- und Wasserbilanz hätte bei einer Vergrößerung des extracellulären Raumes um den retinierten Flüssigkeitsbetrag eine Konzentrierung um 24,7 μ val Natrium/ml stattfinden müssen, wenn die extracelluläre Flüssigkeit mit 20% des Körpergewichtes eingesetzt wird. Die normale Natriumkonzentration des Serums läßt den Schluß zu, daß ein großer Teil des retinierten Natriums in das Gewebe abgewandert sein muß. Unter diesen Bedingungen scheint Vasopressin weder die Natrium- noch die Wasserausscheidung in nennenswertem Umfang zu fördern. In Übereinstimmung mit den Befunden der Tab. 1 u. 2 fand sich keine Verstärkung der Wasserretention, obwohl die Natriumbilanz bei diesen Tieren mit sichtbaren Ödemen stark positiv war.

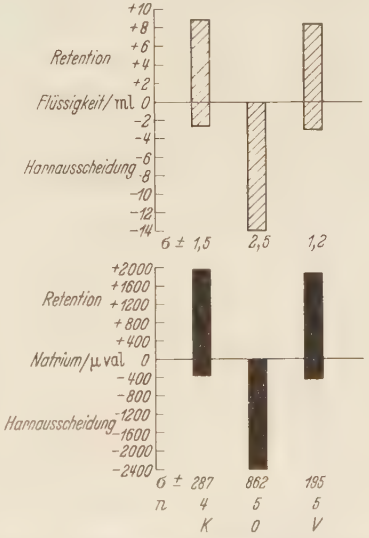


Abb. 5. Diuretische Wirkung von 100 ME Oxytocin während einer 5stündigen Testperiode beim Halocortintyp des Ödems nach 24stündiger oraler Dauerinfusion. *K* Kontrollen. *O* 100 ME Oxytocin. *V* 100 ME Vasopressin ☐ Flüssigkeit, ■ Natrium

Legt man die durch verschiedene Experimente gestützte Hypothese zugrunde, daß diuretische Wirkungen des Vasopressins durch erhöhte Natriumkonzentrationen im Plasma oder der extracellulären Flüssigkeit ausgelöst werden, so entscheidet die Menge des freigesetzten Wirkstoffes

über den Umfang der Ausscheidung des primär retinierten Natriums. Dieser diuretische Effekt läßt sich durch einen biologischen Antagonismus zwischen dem Aldosteron und dem Vasopressin erklären.

Durch die folgenden Versuche haben wir weitere Beweise dafür beibringen können, daß die entscheidende Funktionsstörung, die zur Ausbildung der experimentellen Ödeme verschiedener Intensität führt, mit großer Wahrscheinlichkeit auf einer Beeinträchtigung der Vasopressin-Synthese im Zwischenhirn oder seiner Freisetzung aus der Neurohypophyse beruht. Bei der Aufteilung adrenalektomierter Versuchstiere in

Tabelle 3

	Fl/ml			Na/μval		
	A_0	$C_{1/0}$	$C_{2/0}$	A_0	$C_{1/0}$	$C_{2/0}$
Gesamteinfuhr	48,0	48,0	48,0	7392	7392	7392
Extrarenaler Flüssigkeitsverlust	17,5	17,5	17,5	—	—	—
Einfuhr nach Abzug d. extraren. Fl.	30,5	30,5	30,5	7392	7392	7392
Versuchszahl	11	19	4	11	19	4
Arithmetisches Mittel der Harnausscheidung . .	4,4	9,4	31,6	875	1717	5181
Standardabweichung ($\sigma\pm$)	$\pm$1,3	$\pm$4,7	$\pm$4,0	$\pm$365	$\pm$887	$\pm$684

Abnahme des „Adiuretineffektes" nach Adrenalektomie bei Ratten verschiedener Altersgruppen
A_0 = Ratten der Gruppe A nach Adrenalektomie
$C_{1/0}$ = Ratten der Gruppe C nach Adrenalektomie mit nachlassender,
$C_{2/0}$ = Ratten der Gruppe C nach Adrenalektomie ohne antidiuretische Gegenregulation.

drei Gruppen verschiedenen Alters wurden nach oraler Dauerinfusion der physiologischen Salzlösung einwandfreie Unterschiede im Ausmaß der antidiuretischen Gegenregulation gefunden, die sich bei den ältesten Tieren der Gruppe C_0 (372 g, $\sigma \pm 24$, Alter über 500 Tage) in vollständigem Ausbleiben des „antidiuretischen" Effektes äußerten. Die ermittelten Natrium- und Wasserbilanzen demonstrieren die gefundene Abweichung (Tab. 3).

Die ältesten adrenalektomierten Versuchstiere der Gruppe C, die 3—4 Tage nach der Operation weder Wasser noch Natrium retinierten, wurden nun zur Klärung der Frage herangezogen, ob sich der ausgefallene Effekt durch Vasopressininjektion wiederherstellen läßt. Die Injektion von 4 mal 150 ME Lysin-Vasopressin, verteilt über einen Zeitraum von 24 Std, hatte folgende Wirkung (Tab. 4).

Dieses Versuchsergebnis beantwortet einige Fragen, die im Verlauf dieser Arbeit aufgetreten sind:

1. Reines Vasopressin bewirkt an den ausgewählten nebennierenlosen Tieren Wasser- und dadurch auch Natriumretention. Der erzielte Effekt entspricht im Prinzip dem „Adiuretintyp" des Ödems der Versuchstiergruppe A_0.

Tabelle 4. *Wiederherstellung des „Adiuretineffektes" nach Adrenalektomie durch Vasopressin*

	Fl/ml		Natrium µval	
	ohne antidiuret. Gegenregul.	nach 600 ME Vasopressin 4×150 ME im Abstand v. 6 Std	ohne antidiuret. Gegenregul.	nach 600 ME Vasopressin
Gesamteinfuhr . . .	48	48	7392	7392
Extraren. Fl.	17,5	17,5	—	—
Einfuhr nach Abzug d. extraren. Fl.. . .	30,5	30,5	7392	7392
Arithmetisches Mittel der Harnausscheidung	31,6	10,0	5181	1892
Standardabweichung ($\sigma\pm$)	± 3,9	± 4,0	684	590
Zahl der Versuche . .	4	4	4	4

2. Aus dem Vergleich mit den Ergebnissen der Tab. 1 und 2 läßt sich entnehmen, daß eine Steigerung der Natriumausscheidung durch Vasopressin nur bei vorhandener Nebenniere möglich ist. Diese Wirkung läßt sich durch den Antagonismus zwischen Vasopressin und dem natriumretinierenden Hormon der Nebenniere erklären.

3. Änderungen der Ansprechbarkeit des Tubulusepithels in der Niere auf Vasopressin können für den Ausfall der Natrium- und Wasserretention bei den ältesten adrenalektomierten Tieren der Gruppe C_0 nicht verantwortlich sein.

Aus den Ergebnissen der Bilanzuntersuchungen, die an adrenalektomierten Tieren gewonnen wurden, lassen sich unter Verwendung der letzten Versuchsreihe Berechnungen darüber anstellen, wieviel Vasopressin pro kg Tier von den Ratten verschiedenen Alters aufgebracht werden konnte (Abb. 6). Die Differenzen sind besonders auffällig. Sie sprechen für eine kontinuierliche Abnahme der Neurosekretion bis zum vollständigen Ausfall dieser Leistung des Zwischenhirnes. Derartige altersbedingte Veränderungen waren bisher nicht bekannt. Sie geben

genügend Anlaß zu einer neuen Deutung der Pathogenese des Ödems. Nichts spricht für einen Synergismus, alle Beobachtungen aber für einen Antagonismus zwischen Vasopressin und Aldosteron bei der Steuerung des Mineral- und Wasserhaushaltes. Vasopressin scheint einen regulierenden Einfluß auf die Tätigkeit des Aldosterons auszuüben. Der Ausfall der erwähnten neurosekretorischen Leistung kann die ursächliche Voraussetzung für das Überwiegen der Nebennierenrindenfunktion bilden. Das Verhalten des Oxytocins und seine Beteiligung an diesen Vorgängen muß noch eingehender geprüft werden. Da es sich bei den beobachteten Abweichungen um Alterserscheinungen handelt, dürften sie allgemeines Interesse beanspruchen und dazu beitragen, die bisherigen Ansichten über die Rolle des Vasopressins bei der Entstehung des Ödems zu korrigieren.

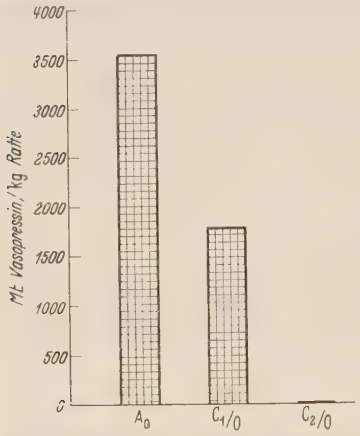


Abb. 6. Abnahme des „Vasopressin-Effektes" bei adrenalektomierten Ratten verschiedenen Alters. A_0 Adrenalektomierte Ratten der Gruppe A mit erhaltener, $C_{1/0}$ Ratten der Gruppe C mit nachlassender, $C_{2/0}$ Ratten der Gruppe C ohne „antidiuretische Gegenregulation"

Für die Unterstützung der Arbeit danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Summary

Under determined conditions constant oral infusion of isotonic saline solution causes changes of the mineral and water metabolism of rats of different age. These changes are produced to study the action of the sodiumretaining hormone of the suprarenal glands and of Vasopressin of the hypophysis in the pathogenesis of edema. Two different disturbances of the mineral and water metabolism are demonstrated. They are named halocortin and adiuretin type of edema.

The synergism and the antagonism of aldosterone and Vasopressin in the regulation of the mineral and water metabolism is discussed. Experiments are done dealing with the effects of synthetic Lysine-Vasopressin under different conditions. During infusion of destilled water synthetic Vasopressin causes water retention and increases the urinary sodium output and sodium concentration. This effect concerning the sodium output and concentration is also observed during infusion of isotonic saline solution. Under these conditions no water retaining effect can be demonstrated whereas Oxytocin increases the sodium and water

output without increasing the sodium concentration of the urine. This is the essential difference between the two hormones. Vasopressin enhances the urinary sodium and water output during infusion of 1.8 per cent sodium chloride solution. The urinary sodium concentration remains unchanged. The same effect is observed in experiments with Oxytocin. The results published by KUSCHINSKY and co-workers are confirmed.

Vasopressin injected four hours after the begin of the oral infusion increases the urinary sodium output and thereby reduces the primary sodium retention during the first phase of the development of edema. Vasopressin administered at the begin of the experiment does not prevent the sodium retention. Most likely "diuretic" effects of Vasopressin can be shown only while the sodium concentration of blood serum and extracellular fluid is increased. These effects are obtained in the presence of the sodium retaining hormone of the suprarenal glands only and are explained as an antagonism to aldosterone.

In contrast to Oxytocin Vasopressin is without diuretic effect in completely developed edema. The reason for this uneffectiveness is thought to be the entering of sodium into the tissue cells.

The retardation of the urinary water and sodium output of adrenalectomized rats decreases with increasing age. The important functional disturbance of the experimental edema is probably an impairment of the biosynthesis of Vasopressin or its release out of the posterior lobe of the hypophysis.

Vasopressin is able to restore the lacking antidiuretic reaction of adrenalectomized animals. From these data the amount of disposable Vasopressin of the different age groups is calculated. The denotation adiuretin typ of edema is justified.

The existing conception concerning the water retaining effect of Vasopressin during development of edema which is thought to be a consequence of the primary sodium retention is evidently not correct.

Literatur

BRUNNER, H., G. KUSCHINSKY u. G. PETERS: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 434 (1956); **228**, 578 (1956). — DEMING, A. B., and J. A. LUETSCHER: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **73**, 171 (1950). — FRASER, A. M.: J. of Physiol. **101**, 236 (1942); J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **60**, 89 (1937). — GAUNT, R., J. H. BIRNIE and W. J. EVERSOLE: Physiologic. Rev. **29**, 281 (1949). — GAUNT, R., CH. LLOYD and J. J. CHART: The adrenal-neurohypophysial interrelationship (Mammalian studies) prepared for the "Symposion on the neurohypophysis" sponsored by the Colston Research Society and University of Bristol, Bristol, England. April 9—12, 1956. — GILMAN, A., and L. GOODMAN: J. of Physiol. **90**, 113 (1937). — GROSS., F. u. R. MEIER: Schweiz. med. Wschr. **1951**, 1013. — HERKEN, H.: Ärztl. Wschr. **1955**, 773; Münchn. med. Wschr. **1956**, 1181. — HERKEN, H., G. SENFT u. H. WILUTZKY:

Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 123 (1956). — Klin. Wschr. **1956**, 781. — Jones, J. Chester: J. of Endocrin. **10**, 11 (1953). — Kuschinsky, G., u. H. E. Bundschuh: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **192**, 683 (1939). — Lotspeich, W. D.: Endocrinology (Springfield, Ill.) **44**, 314 (1949). — Luetscher, J. A., R. Neher u. A. Wettstein: Experientia (Basel) **1954**, 456; **1954**, 22. — Mosher, R. E., A. J. Boyle, E. J. Bird, S. D. Jacobson, T. M. Batchelor, L. T. Iseri and G. B. Myers: J. Clin. Path. **19**, 461 (1949). — Pitts, R. F.: Josiah Macy Found. Adrenal. Cortex Transactions 3 rd conference **1951**. — Sawyer, W. H.: Amer. J. Physiol. **169**, 583 (1952). — Silvette, H., and S. W. Britton: Amer. J. Physiol. **104**, 399 (1933); **123**, 630 (1938). — Verney, E. B.: Proc. Roy. Soc. B. **135** (1947); Brit. Med. J. **1948**, 119. — Vigneaud, V. du, Ch. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis u. S. Gordon: J. Amer. Chem. Soc. LXXV, 4880 (1953).

Professor Dr. H. Herken, Pharmakologisches Institut der Freien Univ., Berlin-Dahlem, Thielallee 69—73

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 301—309 (1957)

Institut für Physiologie, Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg

Der Einfluß der Mg-Konzentration auf die Substrathemmung der ATP-Spaltung — als angebliche Ursache der Erschlaffung des Muskels*

Von

G. Geske, M. Ulbrecht und H. H. Weber

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. Dezember 1956)

I.

Die Erfahrungen mit isolierten Systemen der contractilen Proteine, mit wasser- und glycerinextrahierten Muskelfasern, gewaschenen Muskelfibrillen usw. haben gezeigt, daß solche isolierten contractilen Systeme zugesetztes ATP *kontinuierlich* spalten und sich *kontinuierlich* kontrahieren.

Im Kontraktionscyclus des lebenden Muskels dagegen folgt auf den Reiz die Kontraktion und auf die Kontraktion sehr schnell die Erschlaffung.

Die Entdeckung des „relaxing-factor" durch Marsh hat gezeigt, daß die Dauerspaltung des ATP und die Dauerkontraktion isolierter contractiler Systeme (sog. Muskelmodelle) durch diesen Faktor gehemmt und aufgehoben werden kann. Dieser Faktor kann aus lebenden Muskeln dargestellt werden. Er ist also ein physiologischer Reaktionspartner des contractilen Systems. Die kontraktionshemmende Wirkung des Faktors wird auf zwei Wegen inaktiviert:

1. wenn Ca^{++} zugegen sind[3, 4, 5, 9, 11],
2. wenn die ATP-Konzentration sehr klein ist[9].

Dies gilt offensichtlich auch im lebenden Muskel. Ein lebender Muskel kontrahiert sich sofort, wenn Ca^{++}-Lösungen in das Innere der Faser mikroinjiziert werden[6, 10], und er kontrahiert sich ebenfalls, wenn sein ATP-Spiegel etwa in der Totenstarre oder nach Monojodacetat-Vergiftung beträchtlich unter den physiologischen ATP-Spiegel absinkt [1, 2, 17, 18].

Alle diese Beobachtungen zusammen führen zu folgendem Bild über den vitalen Kontraktionscyclus: In Ruhe spaltet die lebende Faser ATP nicht und kontrahiert sich auch nicht, weil die Wechselwirkungen zwischen dem contractilen Aktomyosin-System und dem ATP durch den „relaxing-factor" blockiert werden. Im Augenblick der Erregung wird dieser Faktor durch die kurzdauernde mit der Erregung verbundene Ionen-Verschiebung zur Reaktion mit Ca^{++} gebracht, dadurch inaktiviert und so die Reaktion zwischen contractilem Protein und ATP für einen kurzen Augenblick freigegeben. Wenn dieser Augenblick vorüber ist, wird der Faktor wieder aktiv. Hierdurch wird die Kontraktion beendet.

Die merkwürdige Tatsache, daß der „relaxing-factor" die Wechselwirkungen zwischen Actomyosin und ATP um so besser hemmt, je höher

* Herrn Professor Dr. Rolf Meier zum 60. Geburtstag in Freundschaft gewidmet.

die ATP-Konzentration ist, ist in Verbindung gebracht worden mit folgender Beobachtung: Unphysiologisch hohe ATP-Konzentrationen führen zu einer Substrat-Hemmung der ATP-Spaltung und Kontraktion, auch dann, wenn kein Faktor vorhanden ist. Es wird infolgedessen die Faktor-Wirkung als eine Erweiterung dieses „überoptimalen" Bereiches der ATP-Konzentration nach unten, auf physiologische Werte der ATP-Konzentration angesehen[9].

Diese Deutung hat Perry[13, 14] dazu geführt, die Bedingungen der Substrat-Hemmung der ATP-Verwertung zu studieren, um auf diese Weise Aufschluß über den Mechanismus der Faktor-Wirkung zu erhalten. Er beobachtete, daß der hemmende überoptimale Bereich der ATP-Konzentration — in Abwesenheit des Faktors — um so später erreicht wird, je höher die Konzentration an Mg^{++} ist. Er faßte seine Beobachtungen in dem Satz zusammen: Der hemmende überoptimale Bereich der ATP-Konzentration beginnt immer dann, wenn die ATP-Konzentration die Mg-Konzentration überschreitet. Das heißt verhältnismäßig kleine ATP-Konzentrationen sind bereits überoptimal, wenn sehr wenig Mg zugegen ist, und auch hohe ATP-Konzentrationen sind noch nicht überoptimal in Gegenwart entsprechend hoher Mg-Konzentrationen.

Aus diesen Beobachtungen schließt Perry, daß die Wirkung des „relaxing-factor" darauf beruhe, daß er die Mg-Konzentration und damit den überoptimalen Bereich der ATP-Konzentration durch Mg^{++}-Bindung sehr stark erniedrige. Die Ca^{++}-Inaktivierung des Faktors deutet er dann als eine Freigabe dieser gebundenen Mg^{++} unter der Wirkung von Ca^{++}.

Daß steigende Mg-Konzentrationen den überoptimalen Bereich der ATP-Konzentration auf höhere Werte verschieben, deutet Perry so: Mg^{++} und ATP bilden mit hoher Affinität Komplexe. Dieser Mg-ATP-Komplex ist das eigentliche Substrat der ATP-Spaltung und damit der Kontraktion. Das überschüssige ATP, das frei bleibt, wenn die ATP-Konzentration größer ist als die Mg-Konzentration, hemmt durch Konkurrenz die Spaltung und Verwertung des Mg-ATP-Komplexes.

II.

Diese Deutung von Perry ist sehr ansprechend. Aber die zugrunde liegende Beobachtung, daß die ATP-Spaltung immer gehemmt werde, wenn die ATP-Konzentration die Mg-Konzentration überschreite, steht mit älteren Beobachtungen von Hasselbach[8] in Widerspruch. Hasselbach fand — gerade entgegengesetzt — daß der überoptimale Bereich in Gegenwart von 10^{-4} m Mg^{++} mit niedrigerer ATP-Konzentration beginnt als in Abwesenheit von Mg^{++}.

Abb. 1 löst diesen Widerspruch. Sie zeigt, daß die Rate der ATP-Spaltung durch Fibrillen in Abwesenheit von Mg^{++} erst kleiner wird, wenn die ATP-Konzentration $3 \cdot 10^{-3}$ m überschreitet. Der Beginn dieses

überoptimalen Abfalls verschiebt sich mit anwachsender Mg-Konzentration zunächst auf niedrigere ATP-Konzentrationen. Er beginnt in Anwesenheit von $5 \cdot 10^{-4}$ m Mg^{++} bereits mit einer ATP-Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ m. Wenn die Mg-Konzentration weiter steigt, verschiebt sich der überoptimale Abfall wieder auf höhere ATP-Konzentrationen.

Für das Anwachsen der Mg-Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ m auf 10^{-2} m trifft außerdem die Beobachtung von PERRY mit großer Annäherung zu, daß der überoptimale Abfall der Spaltung immer dann beginnt, wenn die ATP-Konzentration die Mg-Konzentration überschreitet (Abb. 1).

Die Mg-Konzentration $5 \cdot 10^{-4}$ m ist für die ATP-Spaltung durch Fibrillen demnach ein kritischer Wert: Unterhalb dieses Wertes verschieben steigende Mg-Konzentrationen den Bereich der Substrathemmung nach links — d. h. zu kleineren ATP-Konzentrationen. Oberhalb dieser kritischen Konzentration rückt der überoptimale Bereich mit steigender Mg-Konzentration mehr und mehr nach rechts. Oberhalb dieser kritischen Konzentration beobachtete PERRY, während HASSELBACH die ATP-Spaltung unterhalb dieser kritischen Konzentration maß.

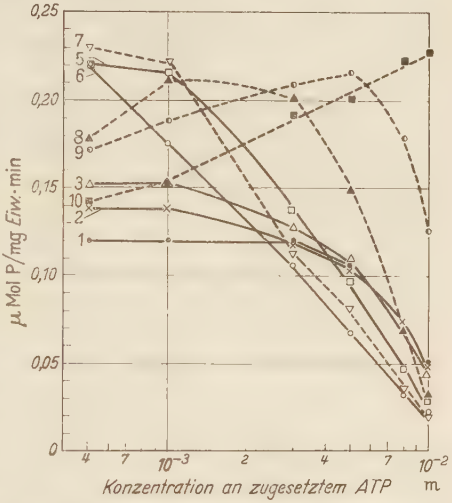


Abb. 1. Anfangsgeschwindigkeit der ATP-Spaltung in Abhängigkeit von der Konzentration an zugesetztem ATP und zugesetzten Mg^{++} (Kaninchenmuskel). Temp. 20° C; p_H 7,0; Ionenstärke 0,14 µ. Die KCl-Konzentration ist so variiert, daß der Ionenstärken-Einfluß wechselnder [ATP] und [$MgCl_2$] kompensiert wird. Kurven: 1: ohne Mg^{++}; 2: 10^{-6}m; 3: 10^{-5}m; 4: $5 \cdot 10^{-5}$m; 5: 10^{-4}m; 6: $5 \cdot 10^{-4}$m; 7: 10^{-3}m; 8: $3 \cdot 10^{-3}$m; 9: $6 \cdot 10^{-3}$m; 10: 10^{-2}m

Diese kritische Mg-Konzentration $5 \cdot 10^{-4}$ m bildet aber außerdem noch eine zweite Grenze: Die ATP-Spaltung am Optimum der einzelnen Kurven wächst nämlich bis zu dem Grenzwert $5 \cdot 10^{-4}$ m Mg^{++} mit steigender Mg-Konzentration. Oberhalb $5 \cdot 10^{-4}$ m Mg^{++} dagegen wächst die optimale Spaltung mit der Erhöhung der Mg-Konzentration nicht mehr weiter (Abb. 1).

III.

Die Darstellung der Abhängigkeit der ATP-Spaltung von der Konzentration des zugesetzten ATP ist unglücklich, falls außerdem noch Mg-Ionen im Ansatz vorhanden sind. Denn Mg^{++} und ATP bilden einen Komplex, dessen Dissoziationskonstante sehr klein ist[12]. Dies führt zu zwei Konsequenzen:

1. Die freie ATP-Konzentration wird gegenüber der zugesetzten ATP-Konzentration um so kleiner, je höher die Mg-Konzentration ist.

2. Sowohl die Konzentration an Mg-ATP wie an freien Mg^{++} variiert innerhalb einer Versuchsreihe, wenn zu Ansätzen gleichen Mg-Gehaltes steigende ATP-Konzentrationen zugesetzt werden, in einer unübersichtlichen Weise. Denn die Konzentration an Mg-ATP nimmt mit Erhöhung der ATP-Konzentration stets zu, solange die ATP-Konzentration die Mg-Konzentration noch nicht erreicht hat. Sobald dagegen die ATP-Konzentration über die Mg-Konzentration hinauswächst, ändert sich die Konzentration von Mg-ATP nur noch wenig, während die Konzentration an freiem ATP stark zunimmt.

Infolgedessen ist in Abb. 2 die ATP-Spaltung dargestellt in Abhängigkeit von der Konzentration an freiem ATP. Hierdurch verschwindet die

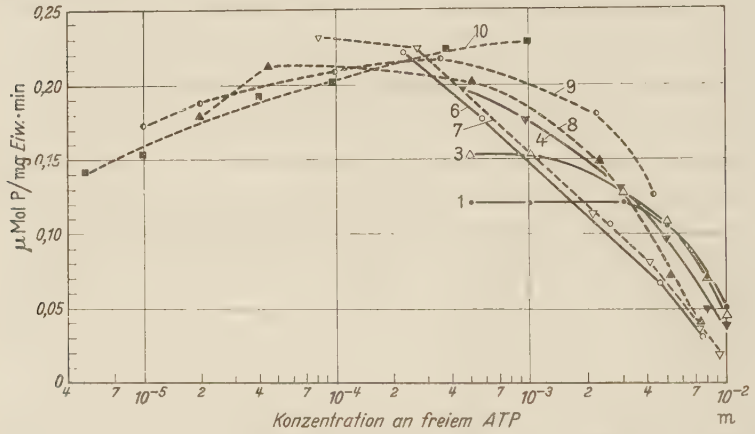


Abb. 2. Die Abhängigkeit der ATP-Spaltung von der Konzentration an freiem ATP und zugesetzten Mg^{++}. Sonst wie Abb. 1

Sonderstellung der Kurven weitgehend, die in Gegenwart hoher Mg-Konzentrationen gewonnen sind (Abb. 2). Das weckt den Verdacht, daß der Einfluß der Mg^{++} auf die Lage der überoptimalen Zone kein direkter Einfluß ist, sondern nur dadurch wirkt, daß er die Konzentration an freiem ATP herabsetzt.

Um die Perrysche These zu prüfen, nach der die Bildung von Mg-ATP dadurch eine direkte Wirkung auf das Enzym-System ausübt, daß Mg-ATP das wahre Substrat der ATP-Spaltung, und das freie ATP ein Hemmstoff sei, wird in Abb. 3 eine weitere Form der Darstellung gewählt: Es werden aus der Gesamtzahl der Versuchsergebnisse die Versuche zu Kurven verbunden, in denen nicht die Konzentration an zugesetztem Mg gleich ist, sondern in denen die Konzentration an Mg-ATP gleich oder sehr ähnlich ist. Gleichzeitig wird die Spaltung jeder einzelnen Kurve in Prozent der maximalen Spaltung angegeben. So werden Kurven-Überschneidungen vermieden, und der Beginn des überoptimalen Abfalls wird deutlicher.

Abb. 3 zeigt nun, daß der überoptimale Abfall mit der höchsten Konzentration an freiem ATP beginnt, wenn kein Mg-ATP neben dem freien ATP vorhanden ist und daß dieser Abfall bei den niedrigsten ATP-Konzentrationen beginnt, wenn etwa 5—10 · 10 $^{-4}$ m Mg-ATP vorhanden ist (Kurven 1, 4 u. 5). Wenn die Konzentration an Mg-ATP bis etwa 10^{-2} m zunimmt, rückt der überoptimale Abfall der Spaltungsrate wieder ein wenig nach rechts zu höheren ATP-Konzentrationen. Doch erreicht er lange nicht die hohen ATP-Werte, mit denen der überoptimale Abfall beginnt, wenn gar kein Mg-ATP im System ist.

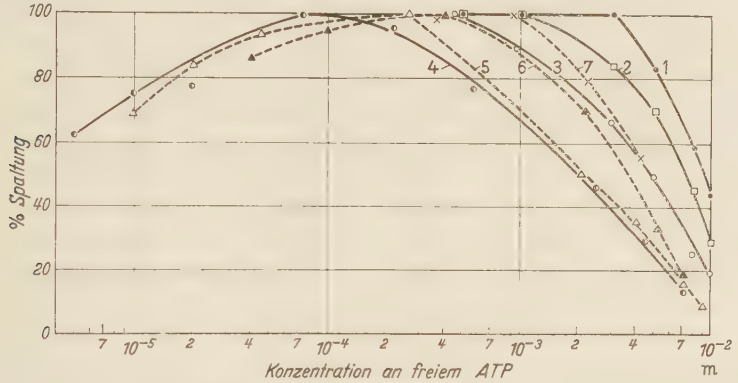


Abb. 3. Die Abhängigkeit der ATP-Spaltungsgeschwindigkeit von der Konzentration an freiem ATP und an Mg-ATP. Die Spaltungsgeschwindigkeit ist ausgedrückt in Prozent der Maximalgeschwindigkeit jeder einzelnen Kurve. Kurven: **1**: ohne Mg-ATP; **2**: $\sim 10^{-5}$m; **3**: $\sim 5 \cdot 10^{-5}$m; **4**: $\sim 4 \cdot 10^{-4}$m; **5**: $\sim 8{,}5 \cdot 10^{-4}$m; **6**: $\sim 3 \cdot 10^{-3}$m; **7**: $\sim 7{,}5 \cdot 10^{-3}$m Mg-ATP

Diese Beobachtungen widerlegen Perrys Annahme, daß Mg-ATP als Substrat und freies ATP als Inhibitor der Spaltung miteinander konkurrieren. Denn in diesem Fall müßte die überoptimale Konzentration an freiem ATP um so höher liegen, je höher die Konzentration an Mg-ATP ist.

Es liegt deshalb nahe anzunehmen, daß das freie ATP das Substrat ist, und daß die Zone der Substrathemmung durch eine Reaktion des freien Mg mit dem Eiweiß beeinflußt wird. Es werden infolgedessen die relativen Umsätze über der freien ATP-Konzentration als Kurven gleichen Gehaltes an freien Mg^{++} aufgetragen. Abb. 4 zeigt, daß mit der Zunahme der freien Mg^{++} von Null bis $2 \cdot 10^{-5}$ m der Beginn der Substrathemmung zu kleineren Konzentrationen an freiem ATP herabrückt (Kurve 1—4). Bei weiterer Erhöhung von etwa $2 \cdot 10^{-5}$ bis etwa $3 \cdot 10^{-1}$ m rückt der Beginn der Substrathemmung wieder auf etwas höhere ATP-Konzentrationen hinauf. Höhere Konzentrationen an freien Mg^{++} sind zusammen mit Konzentrationen an freiem ATP größer als 10^{-3} m — auf Grund der Komplexbildung — nicht existenzfähig.

Die kritische Mg-Konzentration, mit der das Maximum an Aktivierung und das Maximum an Linksverschiebung der Substrathemmung erreicht wird, ist bei der letzten Darstellungsform (Abb. 4) gut eine Zehnerpotenz kleiner als die entsprechende kritische Konzentration der zugefügten Mg^{++} oder des anwesenden Mg-ATP. Das muß auch so sein, weil bei den fraglichen Konzentrationen an freiem ATP nur etwa 10% des zugesetzten Mg frei sind, während der Hauptteil als Mg-ATP gebunden ist.

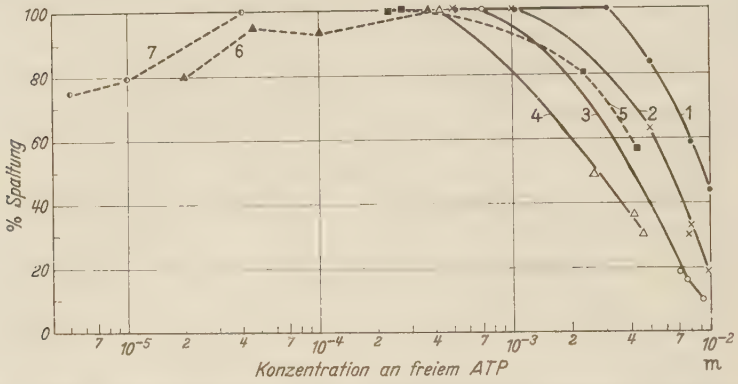


Abb. 4. Abhängigkeit der ATP-Spaltungsgeschwindigkeit von der Konzentration an freiem ATP und freien Mg^{++}. Ordinate: Spaltungsgeschwindigkeit in Prozent der Maximalspaltung jeder einzelnen Kurve. Kurven: 1: ohne freie Mg^{++}; 2: $\sim 10^{-6}$ m; 3: $\sim 10^{-5}$ m; 4: $\sim 2 \cdot 10^{-5}$ m; 5: $\sim 2 \cdot 10^{-4}$ m; 6: $\sim 2{,}5 \cdot 10^{-3}$ m; 7: $\sim 8 \cdot 10^{-3}$ m freie Mg^{++}

Wir können also alle Beobachtungen so zusammenfassen: Erhöhung der Konzentration des zugesetzten Mg von 0 auf etwa $5 \cdot 10^{-4}$ m oder damit gleichbedeutend der freien Mg^{++} von 0 auf etwa $2—5 \cdot 10^{-5}$ m aktiviert die Spaltung optimaler ATP-Konzentrationen steigend. Eine weitere Erhöhung der Konzentration an zugesetzten Mg^{++} auf 10^{-2} m und an freien Mg^{++} auf etwa $3 \cdot 10^{-4}$ m erhöht die Aktivierung nicht weiter. Dieser aktivierende Einfluß des Mg beruht offenbar auf einer Bindung des Mg an das Protein, das bei der kritischen Konzentration von etwa $2 \cdot 10^{-5}$ m freiem und etwa $5 \cdot 10^{-4}$ m zugesetztem Mg gesättigt ist.

Der gleiche Vorgang der Mg-Bindung durch das Eiweiß scheint auch an der Linksverschiebung (zu kleineren Konzentrationen an freiem ATP) der Grenze der Substrathemmung schuld zu sein.

Warum bei weiterer Erhöhung der Mg^{++}-Konzentration der Bereich der Substrathemmung wieder ein wenig nach rechts verschoben wird, bleibt offen*.

* Es erscheint möglich, daß diese Rechtsverschiebung bei hohem Gehalt an Mg-ATP darauf beruht, daß die Ionenstärke unter diesen Umständen kleiner ist als sonst; denn die Ionenstärke wird in diesem Falle fast vollständig von den Mg- und

Dagegen muß beachtet werden, daß beim Zusammentreffen hoher Konzentrationen an zugesetztem ATP und zugesetztem Mg sehr große indirekte Effekte auftreten, die auf nichts weiter beruhen als auf dem Verschwinden des Substrates ATP und des Aktivators Mg durch gegenseitige Komplexbildung.

IV.

Die Vorstellung von Perry, der „relaxing-factor" wirke dadurch, daß er Mg binde, verliert viel von ihrer Wahrscheinlichkeit durch die neuen Beobachtungen über Substrathemmung. Denn der lebende Säugetier-Muskel enthält insgesamt etwa $5 \cdot 10^{-3}$ m ATP und etwa $6—9 \cdot 10^{-3}$ m Mg. Unter der Annahme, daß die angegebenen Konzentrationen dieser beiden Reaktionspartner frei im Faserraum verteilt seien, würde die ATP-Spaltung bei p_H 7 ($5 \cdot 10^{-3}$ m ATP) maximal sein, wie aus der Kurve 9 der Abb. 1 zu ersehen ist. Durch eine Minderung der Mg-Konzentration durch Bindung des Mg an den Faktor auf eine Konzentration von etwa $5 \cdot 10^{-4}$ m würde die Spaltung auf etwa $^1/_3$ absinken (bei einer Gesamtkonzentration an ATP von $5 \cdot 10^{-3}$ m, vgl. Kurve 6 der Abb. 1). In Wirklichkeit hemmt der Faktor aber Spaltung und Kontraktion vollständig. Unter der Annahme, der Faktor erniedrige die Mg-Konzentration noch stärker — etwa auf 0 — würde die ATP-Spaltung in Gegenwart von $5 \cdot 10^{-3}$ m ATP sogar wieder größer (vgl. Kurven 3, 2, 1 der Abb. 1).

In Wirklichkeit hemmt der Faktor um so stärker, je höher seine Konzentration ist und verschiebt in hoher Konzentration den Bereich der Substrathemmung auf viel kleinere ATP-Konzentrationen, als das durch irgendeine Mg-Konzentration überhaupt möglich ist[15].

Methodik

Muskelfibrillen. In Fleischwolf und Waring-Blendor zerkleinerte Kaninchenmuskeln werden mit dem 10fachen Volumen 0,1 m KCl gewaschen und 2 min bei 1800 g zentrifugiert. Der Rückstand wird 8mal in gleicher Weise gewaschen. Vom Rückstand der letzten Zentrifugation wird die oberste Schicht, die Fibrillenschicht, abgehoben und in 50% Glycerin bei —15° C aufbewahrt. Diese Suspension enthält etwa 20 mg Eiweiß/ml und ist mehrere Monate ohne Änderung der ATP-ase-Aktivität haltbar. Vor Gebrauch wird durch Waschen und Zentrifugieren in 10fachem Volumen 0,1 m KCl das Glycerin entfernt. Der Rückstand wird in 0,1 m KCl suspendiert.

ATP-Ionen bestimmt. In der Berechnung aber ist angenommen, daß die Molarität des ATP mit dem Faktor 10 multipliziert werden müßte, um den Beitrag zur Ionenstärke zu erhalten. Dieser Faktor ist für Na-ATP richtig, aber für das entstehende Mg-ATP viel zu hoch. Dadurch, daß die wirkliche Ionenstärke niedriger ist als in den Mg-armen Versuchen, kann in einem Bereich der Ionenstärke zwischen 0,1 und 0,2 μ der überoptimale Abfall erheblich auf höhere ATP-Konzentrationen verschoben werden[8].

Adenosintriphosphat. Das ATP (Na_2ATP) der Firma Papst, Milwaukee, wird mit 1 m NaOH auf p_H 7,0 eingestellt.

Bestimmung der ATP-ase-Aktivität. Pufferung auf p_H 7 durch 0,01 m Tris-Maleinsäure-Puffer[7]. Die Ionenstärke wurde auf 0,14 μ eingestellt, wobei der Ionenstärke-Beitrag durch das ATP zu $10 \cdot x$ gerechnet wurde (x = Molarität des ATP). Die Temperatur der Ansätze wurde mit Wasserbädern auf 20° C konstant gehalten. Nach vier verschiedenen Zeitabständen wurde je ein Aliquot von 4 ml dem Ansatz entnommen, dessen Spaltung mit 3 ml 3%iger Trichloressigsäure unterbrochen wurde. Die Spaltungsdauer war so gewählt, daß nie mehr als 15% des ATP im Ansatz gespalten waren. Aus der Steigung der gewonnenen Zeitkurven ergaben sich die Spaltungsraten. Die Phosphat-Bestimmungen wurden nach Rockstein u. Herron[16] mit dem Elektro-Colorimeter der Fa. C. Zeiss, Oberkochen, durchgeführt.

Berechnung des Mg-ATP. Die Konzentrationen des freien und gebundenen Mg und ATP wurden mit Hilfe der von Martell u. Schwarzenbach[12] angegebenen Komplex-Bildungskonstanten $\frac{[Mg\,ATP]}{[Mg]\cdot[ATP]} = 10^4$ ausgerechnet.

Zusammenfassung

1. Nach Perry beginnt die Substrat-Hemmung der ATP-Spaltung durch Fibrillen mit ATP-Konzentrationen, die um so höher sind, je höher die Konzentration der zugesetzten Mg^{++} ist. Diese Beobachtung ist nur richtig, wenn die zugesetzte Mg^{++}-Konzentration $> 10^{-3}$ m ist.

2. Nach Hasselbach beginnt die Substrat-Hemmung der ATP-Spaltung durch Actomyosin-Gel mit um so niedrigeren ATP-Konzentrationen, je höher die Konzentration der zugesetzten Mg^{++} ist. Diese Beobachtung ist nur richtig, solange die Konzentration der zugesetzten $Mg^{++} < 5 \cdot 10^{-4}$ m bleibt.

3. Die Mg-Konzentration von etwa $5 \cdot 10^{-4}$ m ist nicht nur die Grenze zwischen den unter 1. und 2. beschriebenen Effekten, sondern gleichzeitig auch die Mg-Konzentration, bis zu der wachsende Mg-Konzentrationen die Aktivität der Actomyosin ATP-ase steigern. Bei weiterem Anwachsen der Mg-Konzentration bis zu 10^{-2} m bleiben die Optimal-Werte der ATP-Spaltung konstant.

4. Die Mg-Wirkungen auf die ATP-Konzentration der Substrat-Hemmung werden ähnlich klein wie die Mg-Wirkungen auf die ATP-ase-Aktivität, sobald die Mg-Konzentration einen Wert von etwa $5 \cdot 10^{-4}$ m überschreitet, falls als ATP-Konzentration die Konzentration an freiem ATP und nicht an zugesetztem ATP betrachtet wird.

Abweichende Resultate berücksichtigen nicht, daß hohe Mg-Konzentrationen die Konzentration an freiem ATP durch Komplex-Bildung außerordentlich stark erniedrigen.

5. Diese Feststellungen machen die Perrysche Vorstellung unwahrscheinlich, daß die Wirkung des „relaxing-factor" auf einer Erniedrigung der Mg-Konzentration durch Bindung der Mg^{++} an den Faktor beruhe.

Literatur

[1] Bate-Smith, E. C., and J. R. Bendall: J. of Physiol. **106**, 177 (1947). — [2] Bendall, J. R.: J. of Physiol. **114**, 71 (1951). — [3] Bendall, J. R.: Proc. Roy. Soc. B **139**, 523 (1952). — [4] Bendall, J. R.: Nature (Lond.) **170**, 1058 (1952). — [5] Bendall, J. R.: J. of Physiol. **121**, 232 (1953). — [6] Falk, G., and R. W. Gerard: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **43**, 393 (1954). — [7] Gomori, G.: Methods in Enzymol. **I** 138 (1955). — [8] Hasselbach, W.: Z. Naturforsch. **7** b, 163 (1952). — [9] Hasselbach, W., u. H. H. Weber: B.B.A., **11**, 160 (1953). — [10] Heilbronn, L. V., and F. J. Wiercinski: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **25**, 15 (1947). — [11] Marsh, B. B.: B.B.A., **9**, 247 (1952). — [12] Martell, A. E., u. G. Schwarzenbach: Helvet. chim. Acta **39**, 653 (1956). — [13] Perry S. V.: Proc. of the 3rd Intern. Cong. of Biochim., Brussels 1955. New-York: Acad. Press Inc. 1956. — [14] Perry, S. V., and T. C. Grey: Biochemic. J. **64**, 184 (1956). — [15] Portzehl, H.: B.B.A. (im Druck). — [16] Rockstein, M., and P. W. Herron: Analyt. Chemistry **23**, 1500 (1951). — [17] Sandow, A., and Ch. A. Schneyer: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **45**, 131 (1955). — [18] Weber, H. H., and H. Portzehl: Progr. Biophysics a. Biophysical Chem. **4**, 60 (1953).

Professor Dr. H. H. Weber, Institut für Physiologie im Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg, Jahnstraße 29

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 310—312 (1957)

Institut für Physiologie, Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg

Gibt es eine Kontraktion von Muskelmodellen ohne ATP-Spaltung*?

Von

G. Geske und H. H. Weber

(Eingegangen am 20. Dezember 1956)

Da während der Arbeit des lebenden Muskels in der Regel das ATP eben so schnell wieder aufgebaut wird, wie es zerfällt, schließt Konstanz des ATP-Spiegels während der Muskelzuckung[9, 3, 4] die ATP-Spaltung als Ursache der Kontraktion nicht zwingend aus. Dagegen kann die ATP-Spaltung auf keinen Fall die Ursache der Kontraktion sein, wenn isolierte contractile Systeme (sog. Muskelmodelle) sich unter ATP kontrahieren, ohne das ATP zu spalten. Infolgedessen haben in den letzten 10 Jahren zahlreiche Forscher nach Bedingungen gesucht, unter denen sich Muskelmodelle kontrahieren, ohne das zugesetzte ATP zu spalten. Aber nur Feuer gibt an, solche Bedingungen gefunden zu haben[1]. Damit gewinnt diese einzigartige Beobachtung eine sehr große grundsätzliche Bedeutung.

Feuer gibt an, es sei mit Monojodacetat in dem Konzentrationsbereich $< 0{,}01$—$0{,}005$ m möglich, die ATP-Spaltung durch Modelle vollständig[1, 2], ihre Kontraktion aber nur unvollständig[1, 2] zu unterdrücken. Allerdings würde durch höhere Monojodacetat-Konzentrationen auch die Kontraktion vollständig aufgehoben.

Diese Beobachtung steht im Widerspruch mit früheren Erfahrungen, nach denen die ATP-*Kontraktion* von Actomyosin-Modellen durch Monojodacetat überhaupt nicht beeinflußt wird — selbst dann nicht, wenn die Monojodacetat-Konzentration bis auf 0,05 m erhöht wird[6, 7].

Unter diesen Umständen ist es doppelt wichtig zu wissen, ob die ATP-*Spaltung* in Gegenwart von Monojodacetat verschwindet.

Die Tab. 1 zeigt, daß Monojodacetat bis herauf zu einer Konzentration von 0,05 m die Spaltung nicht im geringsten beeinflußt. Dies gilt für die ATP-ase isolierter Fibrillen bei etwa physiologischer, bei doppelt physiologischer und bei hoher Ionenstärke. Es gilt genau so für Lösungen aus hochgereinigtem Actomyosin. Es gilt schließlich auch bei allen Variationen der Mg- und der ATP-Konzentration, obwohl ohne Gift die Spaltungsraten bei verschiedener Ionenstärke, Mg-Konzentration und ATP-Konzentration sehr verschieden sind[10].

* Herrn Professor Dr. Rolf Meier zum 60. Geburtstag in Freundschaft gewidmet.

Tabelle 1. *Spaltungsrate des ATP durch Muskelfibrillen und Actomyosin-Lösungen in Gegenwart von Monojodacetat* (p_H 7,0; Temp. 20° C)

Ferment-System	[ATP] m	[Mg] m	μ	Spaltungsrate (μMolP/mg Eiweiß · min) für Monojodacetat-Konzentrationen			
				0,00 m	0,005 m	0,01 m	0,05 m
Fibrillen	0,003	0,001	0,8	0,008	0,008	0,008	0,008
..	0,003	0,001	0,3	0,024	0,024	0,024	0,023
..	0,003	0,001	0,09	0,33	0,33	0,33	0,32
..	0,003	0,003	0,13	0,29	0,30	0,30	0,29
..	0,001	0,003	0,13	0,16	0,17	0,17	0,17
..	0,001	0,001	0,11	0,26	—	0,27	0,26
..	0,005	0,001	0,11	0,10	0,10	0,10	0,10
Actomyosin	0,003	0,001	0,6	0,004	0,004	0,004	0,004
„*	0,003	0,001	0,6	0,005	0,005	0,005	0,006

* Spaltungsbeginn nach 1 Std Inkubation mit Monojodacetat.

Reines Monojodacetat ist also offenbar weder ein Kontraktionsgift noch ein ATP-ase-Gift. Die Ergebnisse von Feuer können demnach nur so gedeutet werden, daß das verwendete Monojodacetat entweder freies Jod oder andere giftige Verunreinigungen enthielt* — und zwar in einem Umfang, der in der Arbeit über ATP-Spaltung größer war als in der Arbeit über die Kontraktion der Modelle. Das aber bedeutet, daß auch weiterhin kein Beispiel bekannt ist, in dem eine Kontraktion isolierter Actomyosin-Systeme ohne ATP-Spaltung stattfindet.

Methodik

Die Dauer der Versuche wurde so gewählt, daß nach Unterbrechung der Spaltung mit Trichloressigsäure nie mehr als 20% des ATP im Reaktionsansatz gespalten waren.

Jeder Ansatz (20 ml) enthielt 0,01 m Tris-Maleinsäure nach Gomori[5] als Puffer von p_H 7,0.

Die Phosphat-Bestimmungen wurden nach Lohmann u. Jendrassik[8] durchgeführt.

Die verwendete Monojodessigsäure wurde vor der Zugabe in den Reaktionsansatz mit äquivalenten Mengen an KOH elektrotitrimetrisch neutralisiert, sie enthielt in keinem Fall freies Jod.

Zusammenfassung

1. Monojodacetat bis herauf zu einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-2}$ m beeinflußt weder die ATP-Kontraktion isolierter contractiler Systeme (z. B. extrahierter Muskelfasern) noch die ATP-Spaltung durch isolierte Muskelfibrillen oder hochgereinigte Actomyosin-Lösungen.

* *Nachtrag bei der Korrektur:* Bekanntlich sind schon kleine Mengen von freiem Jod, die aus Monojodacetat abgespalten sind, ein sehr wirksames Aktomyosin-ATP-ase-Gift.

Bailey, K., and S. V. Perry: Biochim. et Biophys. Acta **1**, 506 (1947). — Hasselbach, W.: Z. Naturforsch. **8b**, 212 (1953).

2. Deshalb gibt es auch keine Konzentration an Monojodacetat, in deren Gegenwart isolierte contractile Systeme sich unter ATP kontrahieren, ohne ATP zu spalten.

Entgegengesetzte Beobachtungen von Feuer beruhen offenbar auf Verunreinigungen des Monojodacetat-Präparates, deren Betrag anscheinend in der Arbeit über die ATP-Spaltung größer war als in der Arbeit über die ATP-Kontraktion.

Literatur

[1] Feuer, G.: Acta physiol. (Budapest) **5**, 51 (1954). — [2] Feuer, G., u. M. Wollemann: Acta physiol. (Budapest) **5**, 31 (1954). — [3] Fleckenstein, A.: Der K-Na-Austausch als Energieprinzip in Muskel und Nerv. Springer 1955. — [4] Fleckenstein, A., J. Janke, R. E. Davies and H. A. Krebs: Nature (Lond.) **174**, 1081 (1954). — [5] Gomori, G.: Methods in Encymol. I 138 (1955). — [6] Hasselbach, W.: Z. Naturforsch. 8 b, 212 (1953). — [7] Korey, S.: B. B. A., **4**, 58 (1950). — [8] Lohmann, K., u. L. Jendrassik: Biochem. Z. **178**, 419 (1926). — [9] Mommaerts, W. F. H. M.: Nature (Lond.) **174**, 1083 (1954). — [10] Webfr, H. H., u. H. Portzehl: Erg. Physiol. **47**, 364 (1952).

Professor Dr. H. H. Weber, Institut für Physiologie im Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg, Jahnstraße 29

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 313—324 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität

Acetylcholingehalt des Gehirns und Analgesie nach Einwirkung von Morphin und einigen 3-Oxymorphinanen*

Von

H. Herken, D. Maibauer und S. Müller

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 14. Januar 1957)

Bei den Untersuchungen über den Acetylcholingehalt des Gehirns nach Einwirkung verschiedener Pharmaka konnte bisher kein abschließendes Urteil über die Bedeutung dieses Wirkstoffes für den Ablauf zentralnervöser Funktionen gewonnen werden.

Die Befunde von D. Richter u. J. Crossland (1949) über die Abnahme des cerebralen Acetylcholins bei generalisierten Krampfanfällen haben wir in ausgedehnten Untersuchungen nicht bestätigen können (H. Herken u. D. Neubert, 1953). Dagegen fanden sich in Übereinstimmung mit W. Feldberg (1948, 1950), sowie D. Richter u. J. Crossland (1949) erhöhte Werte in der Narkose, deren Ausmaß durch die Konzentration des angewandten Narkosemittels bestimmt wurde und deutliche Abhängigkeit von der jeweils erreichten Narkosetiefe aufwies. Die Weckwirkung intravenöser Cardiazolgaben führte stets zur sofortigen Wiederherstellung normaler Acetylcholinwerte im Gehirn, so daß hier eine Beziehung zwischen der erzielten Funktionsänderung und dem Acetylcholingehalt zum Ausdruck kam. Neben den gewöhnlichen Narkotica erzeugten auch hohe Dosen von Morphin eine Vermehrung dieses Wirkstoffes im Gehirn, doch hat dieser Vorgang sehr wahrscheinlich eine andere Ursache. Es war nämlich nicht ausgeschlossen, daß dieser Effekt auf den schon von F. Bernheim u. M. L. C. Bernheim (1936) nachgewiesenen cholinesterasehemmenden Eigenschaften des Morphins beruht, denen auch eine gewisse Bedeutung für das Zustandekommen der Analgesie zugeschrieben wurde. Nach den Befunden dieser Autoren ist die Wirkung des Morphins auf die Gehirncholinesterase unter den Bedingungen in vitro nur etwa 10mal geringer als die einer äquimolaren Menge von Eserin. Diese Ergebnisse wurden von verschiedenen Autoren bestätigt und erweitert (G. S. Eadie, 1941, C. I. Wright u. J. C. Sabine, 1943, C. A. Brindley, 1944, M. Greig u. R. S. Howell, 1948, G. S. Eadie, F. Bernheim u. D. B. Fitzgerald, 1948). Einwandfreie Erhöhungen des cerebralen Acetylcholingehaltes sind in vivo auch durch intravenöse Injektion der Cholinesterasegifte Eserin und p-Nitrophenyldiäthylphosphat zu erreichen, die zweifellos auf der Ausschaltung der enzymatischen Hydrolyse des freien Wirkstoffes durch diese Pharmaka beruhen (H. Herken u. D. Neubert, 1953). Dieser Effekt hat aber keine Analgesie zur Folge, worauf O. Schaumann (1952) mit Recht hingewiesen hat. Gewisse Beziehungen zu den mit Morphin erreichten Veränderungen im Acetylcholingehalt des Gehirns können die allerdings

* Prof. Dr. Junkmann zum 60. Geburtstag.

umstrittenen Untersuchungen herstellen, in denen über eine Verstärkung der analgetischen Wirkung des Morphins durch Cholinesterasegifte berichtet wurde (D. Slaughter u. D. W. Munsell, 1940, D. Slaughter, 1950, S. Flodmark u. Th. Wramner, 1945, E. M. Christensen u. E. G. Gross, 1948). Die Befunde wurden von verschiedenen Autoren (H. L. Andrews, 1942, H. W. Stöckli u. K. Fromherz, 1945, D. K. de Jongh, 1954) nicht bestätigt, gaben aber Anlaß zu Diskussionen über das Bestehen ursächlicher Zusammenhänge zwischen der cholinesterasehemmenden und der analgetischen Eigenschaft des Morphins. Die Hypothese über die Verstärkung der analgesierenden Wirkung von Morphin und auch von Laevorphan[1] durch Cholinesterasegifte wurde nicht aufgegeben (B. Bitter, 1953, G. Oehlandt, 1955), so daß bisher kein abschließendes Urteil über die Zusammenhänge zwischen der spezifischen Fermenthemmung und den beobachteten Abweichungen im Acetylcholingehalt des Gehirns für die Auslösung der zentralen Wirkungen dieser Pharmaka erreicht werden konnte.

Durch die Entdeckung der sogenannten Morphinantagonisten, die neben den hypnotischen und den atemlähmenden auch die analgetischen Wirkungen des Morphins[1] beeinträchtigen oder aufheben (K. Unna, 1943, K. Fromherz u. B. Pellmont, 1952, G. Malorny u. F. K. Ohnesorge, 1955, L. A. Woods, 1956 u. a.), schien die Frage nach der ursächlichen Bedeutung der Abweichung im cerebralen Acetylcholinstoffwechsel für das Zustandekommen der Funktionsänderungen einer besseren Bearbeitung zugänglich.

Obwohl schon Untersuchungen über die esterasehemmenden Eigenschaften von Morphin (F. Bernheim u. M. L. C. Bernheim, 1936, G. Tonini, 1955, D. C. Young u. a., 1955) und Laevorphan (L. O. Randall u. a., 1953) vorlagen, haben wir zunächst in orientierenden Versuchen die Wirksamkeit dieser Substanzen an einem gereinigten Acetylcholinesterasepräparat (Winthrop-Stearns Inc. New York) nachgeprüft. Die pharmakologische Analyse der Morphinantagonisten hat gezeigt, daß die Substitution am Stickstoff des Moleküls für die Wirkungen und Nebenwirkungen der verschiedenen Verbindungen von entscheidender Bedeutung ist. Zur Klärung der Frage über die Beziehungen zwischen den analgetischen Effekten und den cholinesterasehemmenden Eigenschaften haben wir auch das Nor-Laevorphan[1] hinzugezogen, dessen Untersuchung auch aus anderen Gründen wünschenswert erschien.

Methodik

Acetylcholinesterase (Winthrop-Stearns Inc. New York) wurde mit Acetylcholin in der Stoffwechselapparatur nach Warburg angesetzt. Das Ausmaß der Hydrolyse ergab sich nach Beendigung des Versuches aus der Bestimmung des

[1] Laevorphan = N-Methyl-3-oxy-morphinan(-tartrat = „Dromoran"). Laevallorphan = N-Allyl-3-oxy-morphinan(-tartrat = „Ro-1-7700"). Nor-Laevorphan = 3-Oxy-nor-morphinan. Morphin lag als Hydrochlorid, die N-substituierten Morphinane als Tartrate, das Nor-Laevorphan als Hydrobromid vor. Für die Überlassung der 3-Oxy-morphinane danken wir der Firma Hoffmann-la-Roche.

unveränderten Acetylcholins am Froschrectus. Mit dieser Methode ließen sich auch geringe Acetylcholinmengen gut erfassen.

Versuchsansatz: Hauptraum: 2,5 ml Phosphatpuffer, p_H = 6,9, m/10 und Mg^{++} (in der Endkonzentration von 10^{-4} m), 0,5 ml Acetylcholin mit 10 γ, 1,0 ml H_2O bzw. die zu prüfende Lösung, Seitenarm: 0,5 ml Acetylcholinesteraselösung mit 10 γ, Gesamtvolumen: 4,5 ml.

Nach dem Temperaturausgleich wurde die Fermentlösung in den Hauptraum des Gefäßes eingekippt. Die Inkubationsdauer betrug 15 min bei 37° C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml einer Eserinlösung 1:1000 beendet. Nach Verdünnung des Reaktionsgemisches im Verhältnis 1:1 konnte der Acetylcholingehalt am Froschrectus getestet werden.

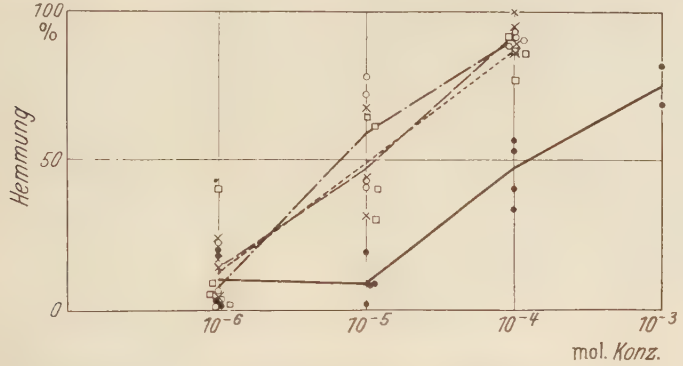


Abb. 1. Hemmung der Acetylcholinesterase in vitro durch Morphin und 3-Oxymorphinane

——— Morphin
— — — Laevorphan
— · — Laevallorphan
- - - - - Nor-Laevorphan

Einzelbestimmung

• Morphin
× Laevorphan
○ Laevallorphan
□ Nor-Laevorphan

Nach den Untersuchungen von D. Nachmansohn (1955) entfaltet die Acetylcholinesterase ihre größte Aktivität bei einem p_H von 8,4. Bei dieser Wasserstoffionenkonzentration kommt es jedoch neben der enzymatischen auch zur alkalischen Hydrolyse von Acetylcholin, die bei der Auswertung unserer Versuchsergebnisse zu erheblichen Störungen geführt hätte. Die enzymatische Aktivität ist bei p_H 6,9 jedoch nur um etwa 20% vermindert, die bei den vergleichenden Analysen nicht ins Gewicht fallen. Die spontane Hydrolyse des Acetylcholins in den Leerversuchen ohne Cholinesterase schwankt unter diesen Bedingungen zwischen 0 und 8%. Die untersuchten Pharmaka (Morphin, Laevorphan, Laevallorphan[1] und Nor-Laevorphan) kamen in einer Endkonzentration von 10^{-3} m bis 10^{-6} m zur Einwirkung. Die Acetylcholinauswertung am Froschrectus wird durch diese Konzentrationen nicht gestört. In zusätzlichen Kontrollversuchen wurde die spezifische Wirkung der Acetylcholinesterase schon zu Beginn durch Zusätze von Eserin ausgeschaltet und dabei eine definierte Acetylcholinmenge quantitativ wiedergefunden. Die angewandten Konzentrationen von Acetylcholin und Acetylcholinesterase waren in Vorversuchen als günstig ermittelt worden. In der Versuchszeit wurden 65% des vorgelegten Acetylcholins gespalten. So konnten auch die verbleibenden Acetylcholinmengen mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden.

[1] Siehe Fußnote auf S. 314

Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Abb. 1 dargestellt. Obwohl die verwendeten Substratkonzentrationen zur Messung der Reaktionsgeschwindigkeit des Fermentes nicht optimal sind, geben die Resultate einen ausreichenden Einblick in die Wirkungsintensität der geprüften Pharmaka. Neben der Bestimmung der cholinesterasehemmenden Eigenschaften von Morphin, Laevorphan und Laevallorphan war die Beobachtung interessant, daß auch das (demethylierte) Nor-Laevorphan in Konzentrationen wirksam war, die denjenigen des Laevorphans entsprachen. Alle Verbindungen sind Cholinesterasegifte, wobei die Oxymorphinane etwa 10mal wirksamer sind als Morphin.

Aus den erhaltenen Werten läßt sich erkennen, daß eine einwandfrei nachweisbare Erhöhung der Acetylcholinkonzentration im Gehirn durch Hemmung der Acetylcholinesterase die Anwendung hoher Dosen erfordert, die das therapeutisch notwendige Maß bei weitem übersteigt. Unter der Voraussetzung einer gleichmäßigen Verteilung der Pharmaka in den Körperflüssigkeiten, wobei angenommen wird, daß 70% des Körpergewichtes zur Lösung der Substanzen dienen, würden wirksame Konzentrationen bei gleicher Empfindlichkeit der Hirnesterase nach Anwendung folgender Mengen erreicht:

		Hemmung der Cholinesterase in % (berechnet nach den Versuchen aus Abb. 1)
200 mg/kg Morphinum hydroch. entspr.	$0{,}9 \cdot 10^{-3}$ mol	70
10 mg/kg Morphinum hydroch. entspr.	$0{,}5 \cdot 10^{-4}$ mol	35
25 mg/kg Laevorphan(-tartrat) entspr.	$0{,}9 \cdot 10^{-4}$ mol	90
10 mg/kg Laevallorphan(-tartrat) entspr.	$0{,}3 \cdot 10^{-4}$ mol	75
30 mg/kg Laevallorphan(-tartrat) entspr.	$1{,}0 \cdot 10^{-4}$ mol	90
25 mg/kg Nor-Laevorphan hydrobrom. entspr.	$1{,}1 \cdot 10^{-4}$ mol	90

Ob derartige Mengen in das Gehirn gelangen, ist natürlich fraglich. J. W. Miller u. H. W. Elliott (1955) fanden bei Untersuchungen über die Verteilung von C^{14} markiertem Morphin, Codein und Methadon[1] im Körper der Ratte, daß bei subcutaner Injektion von 25 mg/kg Codein nach 60 min etwa 10 γ der markierten Substanz in das Gebiet des Hypothalamus eingedrungen waren. Unter den wesentlich ungünstigeren Bedingungen der subcutanen Injektion wurde demnach etwa $^1/_3$ der Menge im Gehirn gefunden, die nach der oben angeführten orientierenden Berechnung erwartet werden konnte. Neben den Streuungen der Versuchsergebnisse spielte anscheinend auch die Struktur der geprüften Verbindung bei der Verteilung eine gewisse Rolle, da der Anteil der im Gehirn gefundenen Menge Morphin bei gleicher Versuchsanordnung

[1] 2-Dimethyla-mino-4-diphenyl-heptanon (5) = „Polamidon".

relativ gering war. Aus den Ergebnissen läßt sich mit ziemlicher Sicherheit schließen, daß eine Anreicherung der untersuchten Analgetica in bestimmten Hirngebieten nicht stattfindet, so daß sich die Verwendung hoher Dosen zur Lösung unserer Fragestellung als notwendig erwies.

Neben der Prüfung der zentralen Wirkung des noch nicht untersuchten Nor-Laevorphans mußten auch die Dosen des Antagonisten ermittelt werden, die zur völligen Aufhebung der analgetischen Effekte von Morphin und Laevorphan in den benutzten hohen Dosen führten.

Zur Testung der analgetischen Wirkung wandten wir die Methode von J. F. Reinhard u. E. J. de Beer (1950) an, bei der die Schwanzwurzel von Ratten durch definierte Stromstöße gereizt wird, die bei einer bestimmten Impulsdauer und Stromstärke von den Versuchstieren mit einem Schrei beantwortet werden. Das Verfahren hat sich nach unseren Erfahrungen als brauchbar erwiesen. Die Reizung erfolgte mit intermittierenden Rechteckimpulsen (30 Hz; Gesamtdauer des Reizes 1 sec). Bei unbehandelten Tieren betrug die Reizschwelle 0,6 Milliamp. bei einer Einzelimpulsdauer von 1—2 msec. Die Stromstärke wurde jeweils um 1 Milliamp. erhöht, wenn der Reizerfolg in einer Versuchsreihe bei einer Einzelimpulsdauer bis zu 10 msec ausblieb. Alle Verbindungen wurden intravenös injiziert. Die höchsten Dosen betrugen etwa die Hälfte bis zwei Drittel der LD 50. Die Feststellung der Wirkungsintensität von Morphin und den 3-Oxy-morphinanen wurde durch Bestimmung der Reizschwelle unmittelbar vor der Injektion und 15—20 min nach Verabreichung der Substanzen vorgenommen.

Tabelle 1. *Wirkung von Morphin, Laevorphan, Nor-Laevorphan und Laevallorphan auf die „Schmerzreaktionen" der Ratte nach elektrischer Reizung der Schwanzwurzel. Mittlere Reizschwelle vor der Injektion 0,6 mA*

Substanz	mg/kg i.v.	mittlere Reizschwelle in mA nach der Inj.	Zahl der Tiere
Morphin	10	6,0	48
	50	9,5	6
	100	15,0	24
	200	20,0	6
Laevorphan	25	20,0	48
Nor-Laevorphan	10	0,6	6
	25	0,6	10
Laevallorphan[1]	10	0,6	6
	30	0,6	9

[1] In dieser Gruppe trat eine geringgradige Erhöhung der Reizschwelle ein, die sich in einer Verlängerung der erforderlichen einzelnen Impulsdauer äußerte.

Morphin und Laevorphan führten — wie erwartet — zu einer beträchtlichen Erhöhung der Reizschwelle, so daß Stromstärken von 20 mA bei einer Verlängerung der Impulsdauer auf 20 msec zur Auslösung einer „Schmerzreaktion" benötigt wurden. Laevallorphan war

ebenso wie das demethylierte Produkt im Analgesietest völlig wirkungslos (Tab. 1). Intravenöse Applikation von Laevallorphan führte zur teilweisen oder völligen Aufhebung der Morphin- und Laevorphan-Analgesie, so daß sich die dazu notwendigen Mengen des Antagonisten durch Senken der Reizschwellenwerte genau ermitteln ließen. Die Beziehung zwischen Impulsdauer und Stromstärke bei der Festlegung der Reizschwelle ist schwierig zu bestimmen, weil sie beträchtlichen individuellen Schwankungen unterliegt. Daher wurde bei der Prüfung des Morphin- und Laevorphan-Antagonisten auf eine genaue statistische Auswertung verzichtet. Wir definierten lediglich drei Intensitätsgrade bei Variation eines bestimmten Dosenverhältnisses von Morphin, Laevorphan und dem Antagonisten, deren Extrem in der völligen Aufhebung der Analgesie erreicht wurde.

Tabelle 2. *Aufhebung der analgetischen Wirkung von Morphin und Laevorphan durch Lacvallorphan*

Morphin mg/kg	Laevallorphan mg/kg	Dosis Morphin / Dosis Laevallorphan	Einfluß auf die Analgesie	Zahl der Tiere
200	8	25 : 1	+++	6
200	4	50 : 1	++	6
100	4	25 : 1	+++	6
100	2	50 : 1	++	6
100	1	100 : 1	+	6
100	0,5	200 : 1	⌀	6
50	2	25 : 1	+++	6
10	0,2	50 : 1	++	12
10	0,1	100 : 1	+	12
10	0,05	200 : 1	⌀	12
Laevorphan mg/kg		Dosis Laevorphan / Dosis Laevallorphan		
25	10	2,5 : 1	+++	8
25	5	5 : 1	++	7
25	1	25 : 1	+	8
25	0,5	50 : 1	+	9
25	0,25	100 : 1	⌀	8

Zeichenerklärung: ⌀ = es ist keine Erniedrigung der Reizschwelle eingetreten; + = es ist eine Erniedrigung der Reizschwelle eingetreten, kein Tier jedoch erreicht den Ausgangswert; ++ = es ist eine Erniedrigung der Reizschwelle eingetreten, ein bzw. mehrere Tiere erreichen den Ausgangswert: starke Wirkung; +++ = alle Tiere haben die ursprüngliche Reizschwelle wieder erreicht, die Analgesie ist aufgehoben.

Bei einem Dosenverhältnis Morphin zu Laevallorphan von 25 : 1 ist die schmerzstillende Wirkung des Morphins in Dosierungen bis zu 200 mg/kg vollständig aufgehoben. Die Dosen des Antagonisten, die für die Aufhebung der Analgesie nach Laevorphan und der Atemdepression nach

Morphin (S. Müller, 1957) notwendig waren, stimmen in der Größenordnung mit den von K. Fromherz u. B. Pellmont (1952) angegebenen überein. Es zeigte sich, daß die Unterbrechung der Laevorphananalgesie wesentlich größere Mengen des Antagonisten erforderte, so daß sich hier eine Dosenverteilung von 2,5:1 ergab (Tab. 2).

Für die Aufhebung der Analgesie ist in dem geprüften Bereich lediglich das Dosenverhältnis des Analgeticums zum Antagonisten, nicht aber die absolute Menge von Bedeutung, wie die Versuche mit Morphin zeigen. Laevorphan wurde daher nur in einer Dosierung geprüft, die bei den folgenden Analysen über die Veränderung des Acetylcholingehaltes im Gehirn Verwendung fand. Für die Beurteilung der Ergebnisse ist noch die Beobachtung wichtig, daß auch die höchsten Dosen des Antagonisten nach der in der Tabelle angegebenen Vorbehandlung mit Morphin oder Laevorphan nicht zu einer Steigerung der Toxicität führten, sondern stets durch Beseitigung der Atemdepression günstig wirkten.

Bestimmung von Acetylcholin im Gehirn

Als Versuchstiere dienten Albinoratten beiderlei Geschlechtes im Gewicht von 120—140 g, die innerhalb dieser Gewichtsklasse nur geringe Schwankungen der Gehirngewichte aufwiesen. Das durchschnittliche Frischgewicht betrug 1,58 g; $\sigma \pm 0{,}048$; $\varepsilon \pm 0{,}015$. Die zu prüfende Substanz wurde in allen Versuchen im Volumen von 0,2—0,5 ml/Ratte intravenös injiziert. In jeder Versuchsreihe wurden stets unbehandelte Tiere als Kontrollen hinzugenommen, um Einflüsse, die durch Herkunft der Tiere und Jahreszeit bedingt sind, zu erkennen. Dosis und Art der Pharmaka sind aus der Tabelle zu entnehmen. Nach der Injektion von Morphin und Laevorphan traten sehr schnell charakteristische Erscheinungen auf, die bei den hohen Dosen meist mit einer erheblichen Beeinträchtigung der Atmung und des Kreislaufes einhergingen. Bei ausgeprägtem Wirkungsbild erfolgte die Tötung der Tiere nach 15—20 min durch schnelle Dekapitation in einem Kühlraum bei einer Temperatur von $+3°$. Bei der Prüfung der Wirkung des Antagonisten auf den Acetylcholingehalt des Gehirns nach Vorbehandlung mit Morphin oder Laevorphan wurden die Tiere weitere 10—15 min später nach vollständiger Aufhebung der Analgesie und der Beseitigung der Atemdepression dekapitiert. Zur Vermeidung von Acetylcholinverlusten durch fermentative Spaltung bei Herstellung der Hirnextrakte muß besonderer Wert auf Schnelligkeit der Präparation und Unversehrtheit des Gehirns gelegt werden. Das Organ wurde in einem eisgekühlten Mörser mit 1,5 ml Trichloressigsäure verrieben, das Gefäß mit weiteren 1,5 ml Trichloressigsäure ausgespült. Das Acetylcholin wurde 90 min in der Kälte extrahiert und von dem Niederschlag durch Zentrifugieren abgetrennt. Merkliche Mengen von Acetylcholin können an das Eiweiß des Zentrifugates adsorbiert werden und müssen durch nochmaliges Auswaschen mit 1 ml Trichloressigsäure und weiteres Zentrifugieren zurückgewonnen werden. Unmittelbar vor der Austestung wurden die kühl aufbewahrten Extrakte nach Zusatz von Bromthymolblau als Indicator mit 1 n-Natronlauge neutralisiert. Dabei sind selbst geringfügige Überschreitungen des Neutralpunktes in den alkalischen Bereich zu vermeiden, die stets zur hydrolytischen Spaltung von Acetylcholin führen. Ferner war die Konstanz der Wasserstoffionenkonzentration für die gleichmäßige Reaktion des Testorganes (Froschrectus) von Bedeutung. Die Extrakte wurden daher stets mit m/10 Phosphatpuffer nach Sörensen p_H 6,9 auf ein Volumen von 7,5 ml aufgefüllt und anschließend

am Froschrectus nach Chang u. J. H. Gaddum (1933) ausgetestet. In einigen Versuchen wurden auch Bestimmungen am Katzenblutdruck durchgeführt, die mit den Auswertungen am Froschrectus übereinstimmten. Die Reaktionen waren jeweils durch Atropin aufzuheben und blieben nach alkalischem Aufkochen der Extrakte aus.

Die Tabelle 3 enthält eine Zusammenstellung der Ergebnisse.

Tabelle 3. *Acetylcholingehalt des Gehirns in γ/g Frischgewicht nach Einwirkung verschiedener Pharmaka* (Gewicht der Versuchstiere 120—140 g)

	Kontrolle	10 mg/kg Morphin	200 mg/kg Morphin	200 mg/kg Morphin + 10 mg/kg Laevallorphan	25 mg/kg Laevorphan	25 mg/kg Laevorphan + 10 mg/kg Laevallorphan	30 mg/kg Laevallorphan	25 mg/kg Norlaevorphan
Versuchsreihe	1	2	3	4	5	6	7	8
Anzahl d. Tiere	66	19	26	13	28	20	16	14
M	2,41	2,52	2,84	2,91	3,30	2,92	2,48	2,40
$\pm\sigma$	0,30	0,15	0,55	0,46	0,24	0,28	0,27	0,12
$\pm\varepsilon$	0,04	0,03	0,11	0,13	0,04	0,06	0,07	0,03

Statistische Auswertung nach dem t-Verfahren (zu Tab. 3)

Miteinander verglichene Versuchsreihen	t	P	Beurteilung
1 : 2	2,2	0,03	nicht signifikant
1 : 3	3,7	0,00025	signifikant
1 : 4	4,4	$< 0{,}0002$	signifikant
1 : 5	16,2	$< 0{,}0002$	signifikant
1 : 6	7,3	$< 0{,}0002$	signifikant
1 : 7	1,17	0,09	nicht signifikant
1 : 8	0,2	0,84	nicht signifikant
3 : 4	0,41	0,68	nicht signifikant
5 : 6	5,28	$< 0{,}0002$	signifikant

Beide Analgetica führen zu einer signifikanten Erhöhung des Acetylcholingehaltes im Gehirn, wobei das Laevorphan dem Morphin überlegen ist. Obwohl die folgende Applikation von 10 mg/kg des Laevallorphans zu einer vollständigen Aufhebung der Analgesie führt, zeigen die Acetylcholinmengen nur im Falle des Laevorphans eine signifikante Verminderung. Es kommt jedoch nicht zu einem Rückgang auf normale Werte. Die Änderung des Acetylcholingehaltes im Gehirn scheint demnach für das Zustandekommen der analgetischen Wirkung bedeutungslos zu sein.

Auch die Annahme, daß der Acetylcholinstoffwechsel durch den Antagonisten nur in bestimmten, für die Auslösung schmerzstillender Wirkungen wichtigen Gebieten des Gehirnes betroffen sein kann, wird

durch das vollständige Ausbleiben des Effektes bei den Versuchen mit Morphin hinfällig. Das Absinken der Acetylcholinwerte könnte natürlich auch dadurch verhindert werden, daß der Morphin- und Laevorphan-Antagonist selbst eine cholinesterasehemmende Wirkung von gleicher Intensität ausübt, wie die Versuche an dem Ferment bewiesen haben. Dieser Einwand, der den fehlenden ursächlichen Zusammenhang zwischen der fermenthemmenden Wirkung und der Analgesie noch bestärken würde, wird aber durch den auffallenden Befund entkräftet, daß die hohe intravenöse Gabe von 30 mg/kg des Antagonisten zu keiner signifikanten Erhöhung des Acetylcholingehaltes im Gehirn führt. Nach diesem Ergebnis schien es fraglich, ob die gefundene Veränderung im Acetylcholinstoffwechsel des Gehirns überhaupt als Folge der cholinesterasehemmenden Eigenschaft der untersuchten Pharmaka anzusehen ist. Auch die Vermutung, daß die Substitution am Stickstoff des Piperidinringes mit der räumlich größeren Allylgruppe vielleicht das Eindringen in die Zelle erschwert, kann nicht zutreffen, weil sich in den Versuchen mit Nor-Laevorphan herausstellte, daß auch diese im Analgesietest unwirksame Verbindung bei gleichen cholinesterasehemmenden Eigenschaften zu keiner nachweisbaren Erhöhung der Acetylcholinwerte im Gehirn führt.

Das Verhalten dieser Substanz schien uns auch aus anderen Gründen interessant. Im Verlauf von Untersuchungen über die Aufhebung der Gewöhnung an Morphin und Laevorphan durch den Phenyldiallylessigsäureester des Diaethylaminoäthanols (H. Herken, W. Hoffmann u. D. Maibauer, 1956) ergaben sich Hinweise, daß die beobachteten Wirkungsverluste, die sich auf die Analgesie erstrecken, nicht durch vermehrte Bindung der Analgetica an Glucuronsäure zu erklären sind, da der geprüfte Phenyldiallylessigsäureester (CFT 1201) derartige Synthesen unbeeinflußt läßt. Auf Grund von Beobachtungen, die B. B. Brodie u. Mitarb. (1955) bei Untersuchungen mit dem Diphenylpropylessigsäureester des Diäthylaminoäthanols (SKF 525 A) gemacht haben, ist anzunehmen, daß auch die von uns geprüfte Substanz oxydative Desalkylierungen verhindert (D. Neubert u. H. Herken, 1955), an denen Fermente aus den Mikrosomen in Gegenwart von TPNH beteiligt sind.

Die völlige Wirkungslosigkeit des demethylierten 3-Oxy-morphinans im Analgesietest sowie das Nachlassen der Atemdepression bei vollständiger Erhaltung der cholinesterasehemmenden Eigenschaften stimmt gut mit den Beobachtungen überein, daß die Gewöhnung an Morphin bzw. Laevorphan zuerst die typischen zentralen Effekte der Verbindungen betrifft. Auch im klinischen Versuch ist bekanntlich das Nachlassen der schmerzstillenden Wirkung stets das am deutlichsten nachweisbare Zeichen des Beginns der Gewöhnung, das zu einer Steigerung der Dosis Anlaß gibt. Ob die peripheren Wirkungen, die oft als „cholinergische" gedeutet wurden, auf den cholinesterasehemmenden Eigenschaften beruhen, ist nicht sicher. Hier kann lediglich festgestellt werden, daß diese Effekte, die offenbar in geringerem Umfang oder erst sekundär der Gewöhnung unterliegen, durch die Demethylierung nicht betroffen

werden. Bei vergleichenden Toxicitätsbestimmungen stellte sich heraus, daß Nor-Laevorphan mit einer LD 50 von 80 mg/kg etwa halb so giftig ist wie Laevorphan.

Bei der abschließenden Beurteilung der vielfach diskutierten Zusammenhänge zwischen cholinesterasehemmenden und schmerzstillenden Wirkungen schien uns eine erneute Überprüfung der Angaben über die Steigerung der analgesierenden Effekte von Morphin durch Cholinesterasegifte notwendig. Sie stützen sich besonders auf die Experimente von D. Slaughter u. Mitarb. (1950), sowie von S. Flodmark u. Th. Wramner (1945), die eine Wirkungssteigerung von Morphin nach Vorbehandlung mit Prostigmin gefunden zu haben glaubten. Bei diesen Untersuchungen ist gar nicht berücksichtigt worden, daß Prostigmin im Gegensatz zu anderen Cholinesterasegiften auch in hohen Dosen nur zu einer geringfügigen Erhöhung des Acetylcholins im Gehirn führt, während äquibiologische Dosen von Eserin die normalen Werte mehr als verdoppeln (H. Herken u. D. Neubert, 1953). Deswegen hielten wir eine Addition „cholinergischer" Wirkungen der Pharmaka im Zentralnervensystem bei Verwendung von Prostigmin für sehr unwahrscheinlich. Unsere Untersuchungen haben eindeutig gezeigt, daß weder Prostigmin noch Eserin in der Lage sind, die analgesierenden Wirkungen von Morphin zu verstärken, und damit die Angaben von D. Slaughter u. Mitarb. (1950) — S. Flodmark u. Th. Wramner (1945) — E. M. Christensen u. E. G. Gross (1948) widerlegt.

Bei der Auswahl der Dosen wurde die größere Toxicität von Prostigmin berücksichtigt. Beide Pharmaka führten in den verabreichten Mengen zu deutlich erkennbaren fibrillären Zuckungen der Muskulatur. Eine Steigerung der Toxicität der Esterasegifte durch Morphin wurde nicht beobachtet (Tab. 4).

Tabelle 4

Analgesietest an Ratten nach Morphin und Morphin + Cholinesterasegiften.
(Sämtliche Pharmaka wurden i.v. appliziert, Erklärung s. Text)

Zahl der Tiere	16	16	8	8
	Kontrolle	5 mg/kg Morphin	5 mg/kg Morphin + 75 γ/kg Physostigmin	5 mg/kg Morphin + 25 γ/kg Prostigmin
Milliamp.	0,6	2,5	2,75	2,1
$\pm \sigma$	0	2,12	2,97	0,87
$\pm \varepsilon$	0	0,53	1,05	0,31

Auch diese Versuche bestätigen, daß die Hemmung der Acetylcholinesterase keine Bedeutung für die Auslösung der zentralen schmerzstillenden Effekte des Morphins haben kann. Es bleibt allerdings ungeklärt, weshalb nur die beiden analgesierenden Verbindungen zu einer Steigerung des Acetylcholingehaltes im Gehirn in vivo führen, während

die im Analgesietest wirkungslosen stark cholinesterasehemmenden Substanzen Laevallorphan und Nor-Laevorphan keine Auswirkungen auf den cerebralen Acetylcholinstoffwechsel erkennen lassen. Offensichtlich handelt es sich dabei nur um die Folgen allgemein zentral lähmender Wirkungen, denen keine ursächliche Bedeutung zukommt.

Summary

The activity of a purified preparation of acetylcholine-esterase is inhibited by morphine, levorphan, nor-levorphan, and levallorphan. The oxymorphinanes are tenfold as active as morphine. It is calculated from the results that high amounts of the drugs are necessary to inhibit the acetylcholine-esterase of brain. Using the pain-threshold-test doses of levallorphan were established which abolished the analgetic effects produced by high amounts of morphine and levorphan.

Nor-levorphan has no analgetic action and is half as toxic as levorphan.

Intravenous injections of morphine and levorphan increase significantly the acetylcholine-content in brain of rats. The subsequent injection of the antagonist levallorphan fails to normalize the acetylcholine-metabolism of brain although analgesia has been completely reversed. The increased concentration of acetylcholine in brain produced by levorphan is considerably reduced by a subsequent application of the antagonist whereas the increase following morphine is not altered.

Change of the acetylcholine-content in brain appears to be meaningless in order to explain the analgetic effects of morphine and levorphan. These changes after application of morphine and levorphan are considered as phenomena caused by the central narcotic effects, but not due to the cholinesterase-blocking properties of the drugs. Both levallorphan and nor-levorphan strong inhibitors of cholinesterase in vitro do not change the acetylcholine-content of brain.

The meaning of the demethylation of levorphan related to total loss of analgesia is discussed with regard to the development of tolerance.

In contrary of results being described in the literature both eserine and prostigmine have not been found to enhance the analgetic properties of morphine.

Literatur

Andrews, H. L.: J. Amer. Med. Assoc. **120**, 525 (1942). — Bernheim, F., and M. L. C. Bernheim: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **57**, 427 (1936). — Bitter, B.: Ärztl. Praxis **V**, 43 (1953). — Brindley, C. A.: Federat. Proc. **3**, 5 (1944). — Chang and J. H. Gaddum: J. Physiol. **79**, 255 (1933). — Christensen, E. M., and E. G. Gross: J. Amer. Med. Assoc. **137**, 594 (1948). — La Du, B. N., L. Gaudette, N. Trousof and B. B. Brodie: J. of Biol. Chem. **214**, 741 (1955). — Eadie, G. S.: J. of Biol. Chem. **138**, 597 (1941). — Eadie, G. S., F. Bernheim and D. B. Fitzgerald: J. Pharmacol. Exper. Ther. **94**, 19 (1948). — Feldberg, W.:

J. of Physiol. **107**, 372 (1948); — Brit. Med. Bull. **6**, 312 (1950). — Flodmark, S., and Th. Wramner: Acta physiol. scand. (Stockh.) **9**, 88 (1945). — Fromherz, K., u. B. Pellmont: Experientia **1952**, 394. — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 136 (1953). — Greig, M., and R. S. Howell: Arch. of Biochem. a. Biophysics **19**, 441 (1948). — Herken, H., u. D. Neubert: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 223 (1953). — Herken, H., W. Hoffmann u. D. Maibauer: Naturwissenschaften **43**, 302 (1956). — de Jongh, D. K.: Acta physiol. et pharmacol. Neerl. (Amsterd.) **3**, 164 (1954). — Malorny, G., u. F. K. Ohnesorge: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 80 (1955). — Miller, J. W., and H. W. Elliott: J. Pharmacol. Exper. Ther. **113**, 283 (1955). — Müller, S.: Med. Diss. Freie Universität Berlin 1957. — Nachmansohn, D.: Erg. Physiol. **48**, 575 (1955). — Neubert, D., u. H. Herken: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 453 (1955). — Oehlandt, G.: Med. Klin. **1955**, 50. — Randall, L. O., J. Kruger, C. Conroy, B. Kappell and W. M. Benson: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 26 (1953). — Reinhard, J. F., u. E. J. de Beer: zit. nach J. H. Burn: Biol. Standardization, 2. Aufl. S. 313, Oxford. 1950. — Richter, D., and J. Crossland: Amer. J. Physiol. **159**, 247 (1949). — Schaumann, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 48 (1952). — Slaughter, D., and D. W. Munsell: J. Pharmakol. a. exper. Ther. **68**, 104 (1940). — Slaughter, D.: Arch. internat. Pharmacodynamie **83**, 143 (1950). — Stöckli, H. W., and K. Fromherz: Helvet. physiol. Acta **3**, 335 (1945). — Tonini, G.: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **31**, 771 (1955). — Unna, K.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **79**, 27 (1943). — Woods, L. A.: Pharmacol. Rev. **8**, 175 (1956). — Wright, C. I., and J. C. Sabine: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **78**, 375 (1943). — Young, D. C., R. A. Ploeg, R. M. Featherstone and E. G. Gross: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **114**, 33 (1955).

Prof. Dr. H. Herken, Pharmakologisches Institut der Freien Universität, Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 325—327 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität des Saarlandes Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. R. Domenjoz)

Der Einfluß der Narkose auf die Wirkung von Natriumsalicylat und Phenylbutazon (Butazolidin Geigy) am experimentellen Pfotenödem der Ratte

Von
R. Domenjoz, K. Mörsdorf, E. G. Stenger, W. Theobald

(Eingegangen am 11. Dezember 1956)

Bekanntermeise führt die Verabreichung von Natriumsalicylat und Phenylbutazon bei der normalen Ratte zu einer markanten Ascorbinsäure- und Cholesterindepletion in den Nebennieren. Für das Natriumsalicylat wurde von van Cauwenberge, Cronheim, Roskam und von Domenjoz berichtet, daß diese Phänomene unter dem gleichzeitigen Einfluß einer Narkose abgeschwächt verlaufen bzw. ganz ausbleiben.

Bei der durch Dextran ausgelösten Schwellung der Rattenpfote konnten wir in wiederholten Versuchen eine gute anti-inflammatorische Wirkung des Natriumsalicylates (500 mg/kg) feststellen. Im Gegensatz dazu ließen Versuche am Formalinödem der Ratte, unter den gleichen technischen Bedingungen wie bei der Dextranschwellung, eine solche Hemmung vermissen. Gross, Kelemen u. Mitarb. und Wilhelmi fanden aber auch bei der durch Formalin ausgelösten Schwellung der Rattenpfote mit 400—500 mg/kg Natriumsalicylat einen inhibitorischen Effekt.

Da die vorgenannten Autoren ihre Experimente am nichtnarkotisierten Tier durchführten, versuchten wir abzuklären, ob die Narkose nicht nur die Depletion, sondern auch die antiphlogistische Wirkung des Natriumsalicylates beeinflußt, wie dies von Roskam angenommen wird. Zum Vergleich untersuchten wir auch Phenylbutazon.

Methode

Wir verwendeten für unsere Untersuchungen männliche, weiße Ratten im mittleren Gewicht von 175 g. Zur Ödemerzeugung injizierten wir plantarseits subcutan in die linke Hinterpfote Formalin (0,1 cm^3 3%ig) und Dextran (Macrodex 0,05 cm^3 6%ig). Natriumsalicylat wurde in einer Dosis von 500 mg/kg subcutan verabreicht. Im Gegensatz zu der von uns vielfach benutzten plethysmometrischen Methode nach Wilhelmi u. Domenjoz, die eine fortlaufende Beobachtung des Schwellungsverlaufes während der ganzen Versuchsdauer gestattet, bestimmten wir, nach Amputation der Pfoten im Tarsocrural-Gelenk das Schwellungsvolumen lediglich zu Ende des Versuches, i. e. 135 min nach Applikation des ödemerzeugenden Agens. Wir benutzten hierbei ein Plethysmometer, bestehend aus Eintauchgefäß und Meßpipette, welche durch einen Gummischlauch miteinander verbunden sind. Das Eintauchgefäß verjüngt sich nach oben und ist mit einer Meßmarke

versehen. Zur Bestimmung des Pfotenvolumens wird zunächst die Wassermenge, die sich im Plethysmometer befindet, ermittelt. Hierzu wird durch Heben oder Senken der Meßpipette der Wasserspiegel mit der Meßmarke in Deckung gebracht. Die amputierte Pfote wird dann untergetaucht und der Meßvorgang wiederholt. Die Differenz der abgelesenen Meßwerte ergibt das absolute Pfotenvolumen.

Zur Bestimmung der Schwellungsintensität wird das Volumen der nichtgeschwollenen Pfote des gleichen Tieres herangezogen. Die Berechtigung hierzu klärten wir in einem Nebenversuch an über 50 unbehandelten Ratten ab. Der Volumenunterschied zwischen rechter und linker Pfote betrug im Mittel weniger als 2%. Die Differenz zwischen rechter und linker Pfote diente uns somit als Maß für die Intensität der entzündlichen Reaktion.

Wie üblich wurden alle Einzelresultate unserer Versuchsreihe statistisch ausgewertet. Wir betrachten ein Ergebnis als signifikant, wenn die ermittelte signifikante Differenz $D \geqq 3$ ist.

Ergebnisse

Unsere in Tab. 1a dargestellten Resultate zeigen, daß Natriumsalicylat imstande ist, das Formalin- und Dextranödem im Sinne einer Entzündungshemmung zu beeinflussen. Die Ergebnisse wurden in einer zweiten Versuchsserie nach 6 Wochen an jeweils 12 Tieren voll und ganz bestätigt (Tab. 1b).

Interessant ist eine vergleichende Betrachtung der Ergebnisse, die unter sonst gleichen Bedingungen (wie Dosis, Applikationsart und Versuchsdauer) an jeweils mindestens 30 narkotisierten Ratten (100 mg/kg s.c. des Diäthylaminsalzes der Isopropylallylbarbitursäure = Numal, WZ-Roche) gewonnen wurden (Tab. 2).

Tabelle 1. *Ödemhemmung am nichtnarkotisierten Tier*

	Tiergewicht	Tierzahl	Schwellungsvolumen in mm³	Hemmung in %	sig. Diff.
a)					
Formalin					
Kontrollen	174	24	234	—	—
Natriumsalicylat . . .	171	24	146	38	3,30
Dextran					
Kontrollen	175	24	492	—	—
Natriumsalicylat . . .	180	24	127	74	8,59
b)					
Formalin					
Kontrollen	178	12	258	—	—
Natriumsalicylat . . .	186	12	154	40	3,66
Dextran					
Kontrollen	178	12	520	—	—
Natriumsalicylat . . .	181	12	173	67	6,94
c)					
Formalin					
Kontrollen	146	23	215	—	—
Phenylbutazon	145	12	85	60	4,35

In den angeführten Versuchen am Formalinödem der mit Numal narkotisierten Ratte ist Natriumsalicylat ohne sichtbare antiphlogistische Wirkung, während am nichtnarkotisierten Tier eine deutliche Hemmwirkung zu beobachten ist. Auch die Ödemhemmung bei der Dextranschwellung ist ohne Narkose stärker ausgeprägt. Dieser Unterschied in der Salicylatwirkung ist offenbar durch die Narkose bedingt, darf aber

Tabelle 2

Substanz	Ödemart	Hemmwirkung	
		mit Narkose %	ohne Narkose %
Natriumsalicylat	Dextran	55	74 bzw. 67
Natriumsalicylat	Formalin	4	38 bzw. 40
Phenylbutazon	Formalin	64	60

nicht verallgemeinert werden. Eine vergleichende Untersuchung von Phenylbutazon (Butazolidin Geigy 200 mg/kg s.c. 30 min vor dem Phlogisticum) zeigt am narkotisierten und nichtnarkotisierten Tier eine gleich starke Entzündungshemmung (Tab. 1c).

Zusammenfassung

Die mitgeteilten Versuche zeigen, daß die Numalnarkose die entzündungshemmenden Eigenschaften eines Antiphlogisticums sichtbar beeinflussen kann. So wurde in unserer Untersuchung die am Formalin- und Dextranödem der Ratte erfaßbare anti-inflammatorische Wirksamkeit des Natriumsalicylates durch eine gleichzeitige Numalnarkose deutlich abgeschwächt. Für die Entzündungshemmung durch Phenylbutazon ließ sich am Formalinödem eine gleichartige Abhängigkeit nicht nachweisen.

Literatur

Cauwenberge H. van: Ann. d'Endocrin. **13**, 390 (1952). — Cauwenberge, H. van, and H. Betz: Lancet **1952**, 1083. — Cronheim, G., and N. Hyder: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med., **86**, 409 (1954). — Domenjoz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 14 (1955). — Domenjoz, R., K. Mörsdorf und E. G. Stenger: Arzneimittel-Forsch. **6**, 591 (1956). — Domenjoz, R., K. Mörsdorf, E. G. Stenger und W. Theobald: Ann. Univ. Sarav. Med. **3**, 302 (1955). — Frank, E.: Dissertation Universität des Saarlandes 1955. Ann. Univ. Sarav. Med. **3**, 267 (1955). — Gross, F.: Schweiz. med. Wschr. **1950**, 697. — Kelemen, E., M. Majoros, J. Ivanyi und K. Kovacs: Experientia (Basel) **6**, 435 (1950). — Roskam, J., u. H. van Cauwenberge: 4. Congr. internat. Thérapeut. Rome. Sept. 1954. — Roskam, J.: Bull. Ac. Suisse des Sciences Médicales **12**, 120 (1956). — Theobald, W.: Arch. internat. Pharmacodynamie **103**, 17 (1955). — Wilhelmi, G.: Die Medizinische **50**, 1591 (1952). — Wilhelmi, G., u. R. Domenjoz: Arzneimittel-Forsch. **1**, 151 (1951).

Prof. Dr. R. Domenjoz,
Direktor des Pharmakologischen Institutes der Universität des Saarlandes,
Homburg/Saar

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 328—334 (1957)

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Rostock

Über die Wirkung sympathicolytischer und parasympathicolytischer Pharmaka auf die Flimmerverschmelzungsgrenze*

Von
K. Flemming

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Januar 1957)

In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, daß nach Einträufelung vegetativer Pharmaka in den Bindehautsack, also bei lokaler Anwendung am Auge, sich die mittels der Flimmerverschmelzungsgrenze (FVG) gemessene optische Sinnesleistung ändert (Flemming). Sie wird durch Sympathicolytica (Regitin) gesenkt und durch Parasympathicolytica (Atropin) gesteigert. In weiteren Untersuchungen sollte nun geprüft werden, ob diese Stoffe bei parenteraler Zufuhr, wenn sie also auch den zentralnervösen Angriffsort der vegetativen Steuerung der FVG erreichen können, gleichartig wirken. Bei dieser Anwendungsweise konnte zudem eine stärkere Beeinflussung der Pupillenweite durch die Pharmaka weitgehend vermieden und die Kreislaufreaktion durch Puls- und Blutdruckmessungen erfaßt werden. — In Vorversuchen wurde eine suggestive bzw. autosuggestive Beeinflussung der FVG-Werte ausgeschlossen. Dies erschien uns u. a. auch deshalb wichtig, weil Altenburger u. Kroll bei Erregbarkeitsprüfungen des optischen Systems objektive Veränderungen im Verlauf neurodynamischer Vorgänge als Folge von Suggestionen gefunden haben.

Die Wirkung von Sympathicomimeticis und Parasympathicomimeticis auf die FVG war sowohl für parenterale als auch für lokale Anwendung bereits bekannt. So konnten Wachholder u. Arnold die vegetative Steuerung der Leistung unseres Lichtsinnesapparates erstmalig dadurch beweisen, daß sie nach Injektion von Adrenalin eine Steigerung, nach Injektion von Prostigmin eine Senkung der FVG feststellten. Außer diesen Hauptwirkungen fand sich ein negativer Vorschlag vor der durch Adrenalin bewirkten FVG-Steigerung und ein Reaktionsrückschlag im Anschluß daran sowie ein Umschlagen der primären Senkung nach Physostigmin in eine sekundäre gegenregulatorische Steigerung. Das gleiche Verhalten der FVG, sowohl für die Haupt- als auch für die Nebenreaktionen, fanden wir nach

* Die Arbeit, deren experimenteller Teil bereits im Jahre 1953 am Physiologischen Institut der Universität Rostock (damaliger Direktor: Prof. Dr. K. Wachholder) durchgeführt wurde, konnte aus äußeren Gründen erst jetzt veröffentlicht werden.

Einträufelung von Adrenalin und Physostigmin in den Bindehautsack. Dies war ein weiterer Beweis für die vegetative Steuerung der optischen Sinnesfunktion und ließ außerdem erkennen, daß der Angriffspunkt dieser Steuerung wenigstens teilweise retinal gelegen ist.

Methodik

Die genaue Beschreibung der zur Bestimmung der FVG verwendeten Apparatur und des Vorgehens bei der Auswahl der Versuchspersonen (VP) findet sich in der Arbeit von Wachholder u. Arnold. Wie dort über die Signifikanz der erhaltenen FVG-Änderung mitgeteilt wurde, betrug die methodische Fehlerbreite der Bestimmung höchstens $\pm$ 0,3 Hertz.

Als sympathicolytische Pharmaka wurden Regitin (W. Z.) = (2-[N-p-Tolyl-N-m-oxyphenyl-aminomethyl]-imidazolin), Dihydroergotamin (DHE) und Hydergin geprüft*. Wegen der sehr unterschiedlichen Wirkungsstärke dieser Stoffe wurden nicht gleich hohe Dosen, sondern solche von ungefähr gleich starker biologischer Wirkung miteinander verglichen. Regitin wurde i.m., DHE und Hydergin im allgemeinen subcutan verabfolgt, DHE außerdem i.m., Regitin und DHE auch peroral. — Als parasympathicolytischer Wirkstoff diente Atropin. — Die Pupillenweite wurde wie in den früheren Untersuchungen mit der entoptischen Methode von Ebbecke kontrolliert.

Ergebnisse

I. Sympathicolytica

a) Regitin. In allen 26 Versuchen reagierte die FVG auf Dosen von 0,075—0,0188 mg/kg i. m. mit einer Senkung; sie stieg dann langsam wieder an und stellte sich — manchmal unter leichtem, mehrphasigem

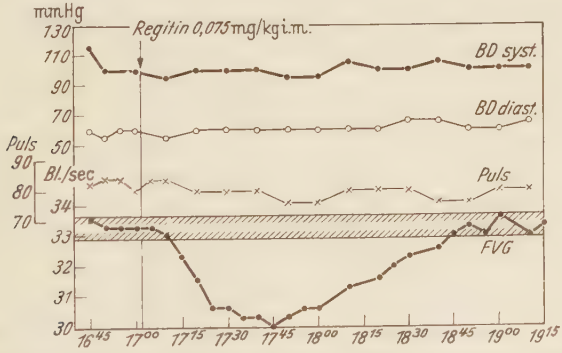


Abb. 1. Senkung der Flimmerverschmelzungsgrenze (FVG) nach Regitin (0,075 mg/kg i.m.)
Methodische und spontane Fehlerbreite: ////

Hin- und Herschwanken — auf den Ausgangswert ein (Abb. 1). Noch geringere Dosen waren wirkungslos. — Perorale Anwendung zeigte bei höherer Dosierung die gleiche Wirkung wie i.m.

* Den Herstellungsfirmen Ciba A. G. (Wehr-Baden) und Sandoz A. G. (Nürnberg) möchten wir hier für die freundliche Überlassung der Präparate nochmals danken.

b) Dihydroergotamin. Bei 23 Versuchen kam es nach 0,015 mg/kg s. c. in allen Fällen zu einem vorübergehenden, mehr oder weniger tiefen Absinken der FVG (Abb. 2), nach niedrigeren Dosen nur in rd. der Hälfte der Fälle.

c) Hydergin. Bei insgesamt 11 Versuchen kam es in je 4 Versuchen mit 0,005 bzw. 0,0025 mg/kg s. c. zweimal zu einer mäßigen FVG-Senkung von 1,0—2,0 Bl./sec; eine schwächere Dosis war wirkungslos.

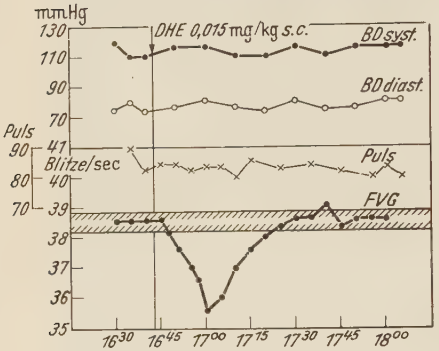


Abb. 2. Senkung der FVG nach Dihydroergotamin (0,015 mg/kg s.c.: ////)

Bei Berücksichtigung von Häufigkeit und Stärke der Reaktionen sowie vergleichender Versuche bei ein- und derselben VP scheint die Wirksamkeit der geprüften Stoffe auf die FVG vom Regitin über das DHE zum Hydergin hin abzunehmen. Der Unterschied zwischen Regitin und DHE kann bei der geringen Zahl der Versuche jedoch nicht unbedingt als sicher angesehen werden. — Auch bei verschiedener Anwendungsweise (s. Meth.) wirkten die Stoffe gleichartig. — Die geringen Schwankungen der Pupillenweite sowie kurzdauernde Puls- und Blutdruckreaktionen nach der Injektion hoher Regitindosen und leichte Pulssenkungen nach 0,015 mg/kg DHE lagen noch im Bereich der Fehlerbreite.

II. Atropin

Nach Atropineinspritzung (1,0; 0,5 und 0,25 mg s. c.) fand sich in 53 von 56 Versuchen eine über die methodische Fehlerbreite hinausgehende Reaktion; diese bestand in 40 Fällen in einer Steigerung, in 13 Fällen in einer Senkung der FVG. Dazu ist ergänzend zu bemerken: Den Steigerungen gingen häufig Senkungen voran. Diese waren meistens so geringfügig, daß sie die Spontanschwankungsbreite bzw. die methodische Fehlerbreite der FVG nicht überschritten (Abb. 3, obere Kurve); nur in 7 Fällen gingen sie über die Fehlerbreite hinaus, blieben aber immer — meistens erheblich — schwächer und kürzer als die anschließenden Steigerungen. Im Anschluß an Steigerungsreaktionen fanden sich signifikante Senkungen nur in 3 Versuchen; in einem dieser Fälle trat eine solche nachfolgende Senkung frühzeitig auf und war stärker als die Steigerung (Abb. 3, untere Kurve). — Bei den Senkungen kam es nach 1 mg Atropin regelmäßig, nach 0,25 mg nur ausnahmsweise, zu intermittierenden Anstiegen, so daß bei kurvenmäßiger Darstellung zwei abwärts gerichtete Zacken entstanden.

Für den Kurvenverlauf und die Latenzzeit sowie für Dauer und Stärke der FVG-Reaktion fanden sich bei verschiedenen Versuchspersonen starke Unterschiede. Bei derselben Versuchsperson dagegen zeigten die FVG-Kurven nicht nur in der Grundreaktion, sondern auch im feineren Verlauf der Kurven nicht selten eine erhebliche Übereinstimmung. Ein individueller Faktor spielt demnach für den Ausfall der Reaktion eine Rolle. Dafür spricht auch die auffällige und weitgehende

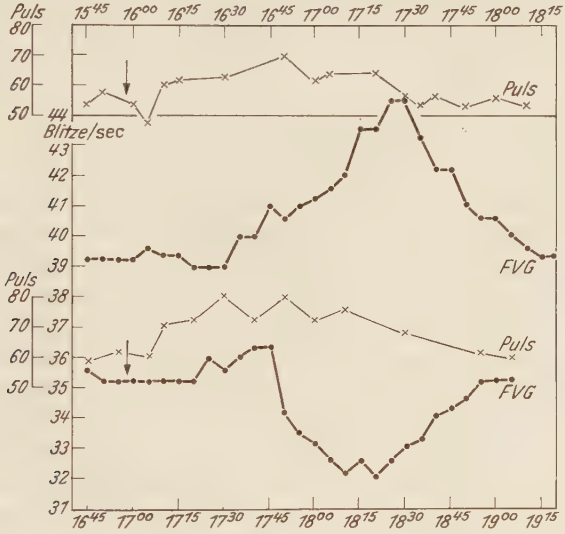


Abb. 3. Verschiedene Wirkung von 1 mg Atropin s. c. (↓) auf die FVG bei derselben Versuchsperson in Abhängigkeit von der Ausgangslage: starker FVG-Anstieg bei hoher, ausgeprägter Senkung nach kurzem Anstieg bei niedriger Ausgangslage; Pulsverhalten dagegen in beiden Versuchen gleich

Gleichartigkeit der Kurven einiger Versuche, in denen nach mehreren Wochen die gleiche Dosis — bei sonst gleichen Bedingungen — ein zweites Mal bei derselben Versuchsperson angewandt wurde. Die Ausgangslage war in diesen Fällen gleich. Daß sie berücksichtigt werden muß, zeigten besonders deutlich zwei Fälle, in denen die Ausgangslage beim Wiederholungsversuch beträchtlich von der des ersten abwich. In dem einen Fall reagierte bei niedriger Ausgangslage die FVG kaum und der Puls sank eher; bei um mehr als 5,0 Bl/sec höherer Ausgangslage (andere Tageszeit) kam es dagegen zu einer langanhaltenden FVG- und Pulssteigerung. Noch stärker ausgeprägt war dies Verhalten in einem zweiten Fall, in dem sich bei niedriger Ausgangslage — nach vorübergehendem Anstieg — eine Senkung der FVG, bei hoher dagegen eine Steigerung einstellte (Abb. 3).

Nach 1 mg Atropin kam es fast ausnahmslos zu einer Steigerung der Pulsfrequenz, der häufig eine leichte, oftmals nicht signifikante,

Senkung voranging (s. Abb. 3, obere Kurve). Nach schwachen Atropindosen fand sich gelegentlich nur eine leichte Pulssenkung ohne nachfolgende Steigerung. — Die Pulssteigerungen waren von der FVG-Steigerung völlig unabhängig. Wie Abb. 3 zeigt, kann die FVG-Reaktion bei etwa gleicher Steigerung der Pulsfrequenz in den beiden Versuchen ganz umgekehrt verlaufen. Die gleiche Unabhängigkeit der Reaktionen voneinander zeigt sich auch bei einem Vergleich von FVG und Blutdruckbeeinflussung. Es finden sich nicht nur häufig starke Unterschiede im Verlauf der Kurven, sondern oft zeigt sich bei deutlicher FVG-Beeinflussung am Blutdruck noch keine Reaktion.

Besprechung der Ergebnisse

I.

Die früher nach Einträufelung sympathicolytischer Pharmaka in den Bindehautsack, also bei lokaler Anwendung, gefundene Beeinflussung der FVG läßt sich, wie gezeigt wurde, auch bei parenteraler bzw. peroraler Anwendung nachweisen. Regitin senkt die FVG, wirkt also genau so wie bei lokaler Anwendung; das ebenfalls den Sympathicus hemmende DHE und das Hydergin wirken im Grunde gleich. Damit ordnen sich diese Befunde denen ein, die über die vegetative Beeinflussung der FVG bisher bekannt wurden. — Bei den Unterschieden in der Wirkungsstärke der einzelnen Pharmaka ist zu berücksichtigen, daß ihre Angriffsorte verschieden sind. Während die halbsynthetischen Mutterkornderivate einen mehr zentralen Angriffspunkt besitzen, greift Regitin vorwiegend peripher an. Über eine zentrale Regitinwirkung ist nichts bekannt. Daher ist anzunehmen, daß es seine starke Wirkung auf die FVG ebenfalls durch peripheren Angriff, also retinal, erzielt. Die retinale Lokalisation eines vegetativen Steuerungsmechanismus für die FVG haben wir früher wahrscheinlich gemacht. Die jetzt gefundene stärkere Regitinwirkung im Vergleich zum DHE und Hydergin spricht dafür, daß der Angriffsort für die vegetative Regulation vorwiegend peripher gelegen ist.

II.

Das Auftreten von FVG-Steigerungen nach parenteraler Anwendung des parasympathicolytisch wirkenden Atropins stimmt mit den früher nach lokaler Homatropinanwendung erhaltenen Ergebnissen überein und läßt sich in die auf W. R. Hess zurückgehenden Vorstellungen über die vegetative Regulierung animaler Funktionen ohne weiteres einordnen. Aber auch die in einer kleineren Anzahl von Fällen auftretenden FVG-Senkungen sind verständlich.

Als Teilausdruck der Ambivalenz vegetativer Pharmaka kann — vor allem nach kleinen Dosen — eine primäre Wirkungsumkehr auftreten. Für das Adrenalin

ist eine Vasodilatation nach ganz kleinen Mengen im Gegensatz zur Vasokonstriktion nach größeren Mengen altbekannt. Neuerdings wurden solche ambivalenten Wirkungen des Adrenalins von Brose u. H. Schaefer bei Untersuchungen an den Kranzgefäßen, von Bülbring für den Tonus und den O_2-Verbrauch von Darmmuskulatur gefunden. Hierher gehört auch ein der Grundreaktion entgegengesetzter Vorschlag, wie er von Siedek u. Häusler nach schwachen Reizen verschiedenster Art beobachtet wurde und Siedek veranlaßte, das zweiphasige Schema der vegetativen Gesamtumschaltung von Hoff zu einem „Dreitaktschema" der vegetativen Reaktionsweise zu erweitern. Für das Atropin wurde eine der Pulssteigerung vorangehende Pulssenkung schon vor langer Zeit gefunden (v. Schroff; v. Bezold). Senkungen im Anschluß an Steigerungen sind als gegenregulatorische Rückschläge von sympathischer auf parasympathische Erregung und umgekehrt in der Physiologie allgemein bekannt.

Bei Berücksichtigung der Reaktionsweisen des vegetativen Nervensystems und der für das FVG-Verhalten vorliegenden Befunde (s. Einl.) ergibt sich somit folgendes Bild für die nach Atropin auftretenden FVG-Veränderungen: Die Grundreaktion ist eine FVG-Steigerung. Sie kann durch negative Vorschläge, gelegentlich auch durch gegenregulatorische Senkungen, modifiziert werden. Nach kleinen Dosen kann manchmal eine leichte Senkung als einzige Reaktion auftreten, wie es Wachholder u. Arnold schon beim Adrenalin fanden. — Die FVG wird durch Atropin also ähnlich beeinflußt wie der Puls. Doch ist die Pulsreaktion, wie auch die des Blutdrucks, von der FVG-Reaktion unabhängig und kann im Einzelfall ganz anders verlaufen. Die FVG ist im Vergleich zu Puls und Blutdruck der empfindlichere Indicator. — Die individuell verschiedene Reaktionsweise auf Atropin hat — wie für andere Funktionen, insbesondere den Kreislauf, bekannt — einen erheblichen Einfluß auf den Verlauf der FVG-Kurven. Ein weiterer modifizierender Faktor ist die Ausgangslage, indem bei hoher Ausgangslage eine Steigerung, bei niedriger dagegen eine Senkung erfolgen kann.

Eine dementsprechende Beobachtung wurde kürzlich von Wachholder u. Schneider nach Coffeinbeeinflussung der FVG durch Trinken von Bohnenkaffee gemacht. Es kam bei trophotroper (parasympathischer) Ausgangslage und entsprechend tiefem Ausgangsniveau der FVG zu einer noch stärkeren und langandauernden Senkung derselben, bei ergotroper (sympathischer) Ausgangslage und damit entsprechend höherem Ausgangsniveau zu einer starken Steigerung. Hierzu passende Beobachtungen sind in neuerer Zeit auch von Straube u. Auell sowie von Siedek u. Häusler und von Zach mitgeteilt worden. Diese Autoren fanden, daß Acetylcholin in der Haut bzw. am Stoffumsatz bei trophotroper Zustandslage des Organismus eine stärkere Wirkung entfaltet.

Zusammenfassung

Die an der Flimmerverschmelzungsgrenze (FVG) gemessene Leistungsfähigkeit des Lichtsinnesapparates wird durch parenterale Gaben sympathicolytischer Pharmaka (Regitin, Dihydroergotamin, Hydergin) herabgesetzt, durch das parasympathicolytisch wirkende Atropin dagegen gesteigert. Für den Reaktionsausfall nach Atropin spielt ein

individueller Faktor eine Rolle, ferner zeigen sich ambivalente Wirkungen.

Es werden Fälle beobachtet, in denen bei hoher Ausgangslage die FVG nach Atropin noch weiter gesteigert wird, bei niedriger Ausgangslage dagegen nach kurzer Steigerung eine starke Senkung auftritt.

Die FVG reagiert empfindlicher auf die geprüften Stoffe als Puls und Blutdruck. Wesentliche Beeinflussungen der Ergebnisse durch Änderungen der Pupillenweite oder durch Suggestivwirkungen konnten ausgeschlossen werden.

Herrn Prof. Dr. K. Wachholder danke ich für seine wertvollen Ratschläge bei der Niederschrift der Arbeit.

Literatur

Altenburger, H., u. F. W. Kroll: Z. Neur. **124**, 538 (1930). — v. Bezold, K., u. Bloebaum: Untersuchungen a. d. physiol. Laborat. in Würzburg 1867, I, 1. — Brose, W., u. H. Schaefer: Z. Biol. **106**, 81 (1953). — Bülbring, E.: J. of Physiol. **122**, 111 (1953). — Ebbecke, U.: Tagg. Dtsch. Physiol. Ges. Göttingen 1949, s. Ber. Physiol. **139**, 211 (1950). — Flemming, K.: Z. Biol. **107**, 284 (1954). — Häusler, H. Ph.: Wien. med. Wschr. **1952**, 259; Schweiz. med. Wschr. **1952**, 528. — Häusler, H. Ph., u. H. Siedek: Cardiologia (Basel) **1951**, 233. — Hess, W. R., in v. Monakow: Neurol. u. psychiatr. Abhandlungen, Heft 2, Zürich. — Hess, W. R., u. F. E. Lehmann: Pflügers Arch. **211**, 603 (1926). — Hoff, F.: Klin. Wschr. **1934**, 519. — Schneider, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 393 (1956). — von Schroff, K. D., Fröhlich u. Lichterfels: Z. d. Ges. d. Ärzte zu Wien **1**, 211 (1852). — Siedek, H.: Wien. klin. Wschr. **1951**, 687; Acta neurovegetativa (Wien) **11**, 94 (1955). — Straube, G., u. Auell: Arch. physik. Ther. **4**, 32 (1954). — Wachholder, K., u. H. Arnold: Z. Biol. **107**, 252 (1954). — Wachholder, K., u. W. Schneider: Klin. Wschr. **1956**, 276. — Zach, F. St.: Wien med. Wschr. **1952**, 73.

Dr. Kurt Flemming, Pharmakologisches Institut der Universität, Greifswald, Friedrich-Loeffler-Str. 23d

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 335—346 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke)
und der
Neurologisch-Psychiatrischen Universitätsklinik Wien
(Vorstand: Prof. Dr. H. Hoff)

Apomorphinwirkung auf das Kaninchen-EEG

Von
F. Brücke, H. Petsche, S. Sailer und Ch. Stumpf

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 19. November 1956)

In einer früheren Untersuchung (Brücke u. Mitarb.) konnte die Beobachtung gemacht werden, daß Apomorphin am wachen Kaninchen ECG-Veränderungen bewirkt, die denen nach elektrischer Reizung des ascendierenden reticulären Systems bzw. nach sensibler oder sensorischer Reizung am nicht narkotisierten Tier auftretenden praktisch völlig gleichen. Insbesondere Untersuchungen von Bonvallet u. Mitarb. und Hiebel u. Mitarb., sowie von Bradley, Bradley u. Mitarb. und Elkes u. Mitarb. haben aber klar erkennen lassen, daß Substanzen, die rein äußerlich das Bild einer „arousal reaction" im EEG bewirken, einerseits nicht unbedingt das ascenzierende reticuläre System erregen müssen und andererseits in verschiedenen, anatomisch lokalisierbaren Stellen dieses Systems ihren Angriffspunkt haben können. Eine Lokalisierung des Angriffspunktes solcher Substanzen ist vor allem durch Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Durchtrennungen des ZNS auf die durch die Substanz ausgelösten EEG-Veränderungen möglich. Darüber hinaus können auch Untersuchungen über die Beeinflußbarkeit dieser EEG-Veränderungen durch andere Substanzen wertvolle Hinweise liefern. In der vorliegenden Arbeit wird über derartige Untersuchungen nach Apomorphinapplikation berichtet und insbesondere werden auch die durch Apomorphin ausgelösten Veränderungen des Kaninchen-EEG einer genaueren Analyse unterzogen.

Methodik

Die Versuche wurden an insgesamt 37 wachen, nicht curarisierten Kaninchen im Gewicht von 1,8—2,2 kg durchgeführt. Die Freilegung des Schädeldaches zur Fixierung der Elektroden erfolgte nach vorheriger reichlicher Infiltration der Kopfhaut mit 2%iger Novocainlösung ohne Adrenalinzusatz.

Das EEG wurde nach der von Monnier u. Laue angegebenen Methode abgeleitet und mit Hilfe eines direktschreibenden 8-Kanal-Elektroencephalographen, Marke Schwarzer, Type E 502, registriert. In den meisten Versuchen waren die Elektroden

extradural über der Area praecentralis, parietalis und striata lokalisiert, in einigen Versuchen wurde zusätzlich eine 6fach Tiefen-Reihenelektrode 4,5 mm paramedian verschieden tief in das Gehirn eingeführt, wobei insbesondere vom dorsalen Rhinencephalon und vom Thalamus abgeleitet wurde. In allen Fällen erfolgte die Ableitung bipolar. Über nähere Einzelheiten der Methode siehe Monnier u. Laue, sowie Brücke u. a.

In 7 Versuchen wurden Durchtrennungen des Hirnstammes in verschiedenen Höhen ausgeführt. In dieser Versuchsserie wurden Trepanlöcher (Durchmesser: 7 mm) median unmittelbar vor bzw. hinter der Sutura lambdoidea unter Schonung der Dura angelegt und die Dura erst unmittelbar vor der Stammhirndurchtrennung aufgeschnitten. Die Kontrolle der Lage und des Ausmaßes der Durchtrennung erfolgte am Formol-fixierten Gehirn durch makroskopische Inspektion. Außerdem wurde schon während des Versuches die Wirksamkeit der Durchtrennung in der Weise geprüft, daß der Effekt einer Reizung (z. B. proprioceptive Reizung durch passives Beugen und Strecken einer hinteren Extremität), die vor der Durchtrennung eine typische „arousal reaction" bewirkte, nach der Durchtrennung neuerlich untersucht wurde. Nach allen 7 Durchtrennungen waren derartige Reizungen ohne jeden Einfluß auf das EEG.

Apomorphinum hydrochloricum wurde vor jedem Versuch frisch gelöst. In einigen Fällen zeigte die Lösung eine leichte Grünfärbung; irgendein Wirkungsunterschied gegenüber einer völlig farblosen Lösung gleicher Konzentration konnte nicht festgestellt werden. Im Rahmen der Untersuchungen über die Beeinflußbarkeit der Apomorphinwirkung wurden folgende Substanzen getestet: Atropinum sulfuricum, Scopolaminum hydrobromicum, 10-(γ-dimethylaminopropyl)-2-chlorophenothiazin („Largactil" Specia), N-Methyl-cyclohexenyl-methylbarbitursaures Natrium („Evipan-Natrium" Bayer), α,β-Dihydroxy-γ-(2-methylphenoxy)-propan („Myanesin", The British Drug Houses Ltd.) und α,β-Dihydroxy-γ-(2-methoxyphenoxy)-propan („Myoscain" Holzinger).

Ergebnisse

Nach Zufuhr einer wirksamen Apomorphindosis (4—5 mg/kg s.c. oder i.m. bzw. 0,25—0,5 mg/kg i.v.) traten im EEG zum Zeitpunkt der voll ausgeprägten Wirkung in allen Ableitungen jene Charakteristica in Erscheinung, wie sie für die Weckreaktion („arousal reaction") kennzeichnend sind. Im einzelnen zeigte das EEG gegenüber dem EEG vor der Apomorphinapplikation folgende Veränderungen (vgl. Abb. 1):

a) Präcentral Vorherrschen einer niedrigen, höher frequenten (25 bis 30 Hz) Tätigkeit bei gleichzeitigem völligen Fehlen der 10—15 Hz-Spindeln und der langsamen Wellen (Abb. 1B).

b) Parietal und über der Area striata fand sich eine regelmäßige 5—6 Hz-Tätigkeit, die etwa an der Grenze zwischen Area parietalis und Area striata eine Phasenumkehr aufwies (Abb. 1C).

c) Mit Hilfe der 6fachen Tiefen-Reihenelektrode konnte vom dorsalen Rhinencephalon (Ammonshorn) mit höchster Amplitude (in einem Fall bis 5,5 mV) ebenfalls eine 5—6 Hz-Tätigkeit abgeleitet werden, die, weil sie in strenger Phasenabhängigkeit von der oben erwähnten Tätigkeit an der Rinde stand, als mit dieser kohärent aufgefaßt werden muß; sie zeigte auch im Ammonshorn eine bipolare Phasenumkehr (Abb. 1C). Diese

Tätigkeit ließ sich nach rückwärts bis unter die retrospleniale Region verfolgen, wurde aber weiter rückwärts zunehmend von einer langsamen, unregelmäßigen Tätigkeit überdeckt. Bei weiterem Einführen der Tiefenelektrode nahm die beschriebene 5—6 Hz-Tätigkeit ab; etwa 2 mm tiefer, im vorderen Thalamuskerngebiet betrug ihre Amplitude nur mehr $^1/_3$ der Amplitude im Ammonshorn. An der unteren Grenze des Thalamus war

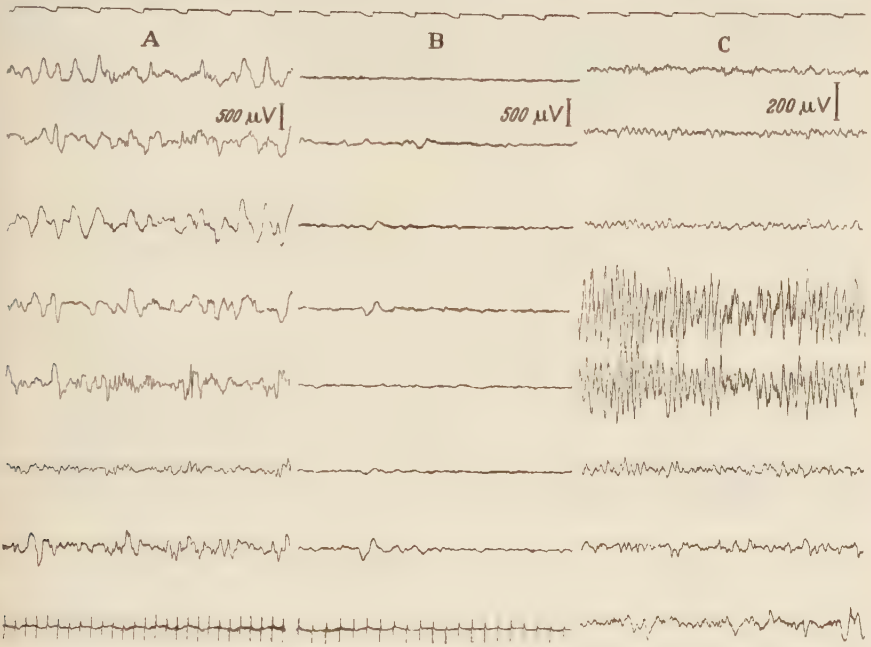


Abb. 1. Kaninchen-EEG vor (A) und 35 min nach 5 mg/kg Apomorphin i.m. (B und C). — Ableitungen in A und B (von oben nach unten): (1) Links präcentral — parietal, (2) links parietal — Striata, (3) rechts präcentral — parietal, (4) rechts parietal — Striata, (5) Präcentral rechts — links, Parietal, rechts — links, (7) Striata rechts — links, (8) EKG. — Ableitungen in C (von oben nach unten): (1) linker Bulbus olfactorius, (2) links präcentral — parietal, (3) links parietal — Striata, (4—8) 6fache Tiefen-Reihenelektrode, rechts, 5 mm subcortical, frontooccipital. Hohe 6 Hz-Tätigkeit im dorsalen Rhinencephalon (Ableitungen 4 und 5). — Zeitschreibung: 1 sec

diese Tätigkeit noch deutlich nachweisbar; sie konnte in dieser Ebene bis zum Nucleus ruber verfolgt werden, wobei jedoch mit zunehmender Tiefe eine immer stärkere Überlagerung mit anderen Aktivitäten auftrat.

Die an der Rinde über der Area parietalis und striata und in der Tiefe mit maximaler Amplitude vom Ammonshorn abgeleitete 5—6 Hz-Tätigkeit zeigte bei Unruhe des Tieres oder unter Einwirkung starker Reize einen vorübergehenden Zerfall, wobei vermehrt rasche Frequenzen im Betabereich auftraten und die Tätigkeit sehr frequentinkonstant wurde. Bei Tötung des Tieres mit Äther blieb diese Tätigkeit in sehr regelmäßiger Folge im Ammonshorn am längsten bestehen.

Schließlich ließ sich diese Tätigkeit durch intermittierende Lichtreizung (Flackerlicht) besser als die Tätigkeit am unbehandelten Kaninchen im Bereich von etwa 3—24 Hz steuern.

Die oben beschriebenen EEG-Veränderungen traten unmittelbar nach der i.v.Apomorphininjektion (0,25—0,5 mg/kg) auf und blieben für eine Zeit von etwa 10—30 min bestehen. Die niedrigste intravenöse Apomorphindosis die eben eindeutige EEG-Veränderungen bewirkte, betrug 0,1—0,2 mg/kg. Nach intramuskulärer oder subcutaner Zufuhr einer sicher wirksamen Apomorphindosis (4—5 mg/kg) traten die beschriebenen EEG-Veränderungen — Versuch zu Versuch stark variierend — erst nach einer

Abb. 2. Spannungsintegration. Die bioelektrische Tätigkeit wurde über einer fronto-occipitalen Ableitung registriert und integriert; Ablesung der Werte alle 20 sec. Abnahme der durchschnittlichen corticalen Spannungsproduktion nach 5 mg/kg Apomorphin i.m. (Pfeil) auf etwa $^1/_3$. — Abszisse: Zeit in Minuten; Ordinate: Spannungsproduktion (willkürlicher Maßstab)

Latenzzeit von 3—15 min allmählich in Erscheinung: Die Aktivierungsperioden dauerten zunächst jeweils 2—10 sec an, zwischen ihnen war ein völlig normales Ruhe-EEG mit frontalen 10—15 Hz-Spindeln. Dann wurden die einzelnen Aktivierungsperioden immer länger, gleichzeitig die Perioden des normalen Ruhe-EEG immer kürzer und seltener. Die gegenüber Apomorphin restistenteste Konfiguration des Ruhe-EEG schienen die frontalen Spindeln zu sein. In einzelnen Versuchen war vor dem Einsetzen der vollen Apomorphinwirkung ein EEG zu beobachten, das in den präcentralen Ableitungen durch die beschriebene hochfrequente, niedrige Aktivität gekennzeichnet war, die jedoch in mehr oder weniger regelmäßigen Abständen von etwa 10—20 sec von je einer Spindelbildung unterbrochen wurde.

Um genauere Aufschlüsse über den zeitlichen Verlauf der EEG-Veränderungen nach Apomorphinzufuhr zu gewinnen, wurde in einem Versuch nach 5 mg/kg Apomorphin i.m. fortlaufend die Spannungsproduktion integriert und gleichzeitig eine Frequenzanalyse durchgeführt. Die Bestimmung der Spannungsproduktion erfolgte hierbei nach einer von Marko u. Petsche entwickelten Methode, wobei das EEG über einen Anpassungsverstärker einem modifizierten Ampère-Stundenzähler

zugeführt wurde. Abb. 2 gibt die erhaltenen Ergebnisse wieder. Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, war die Spannungsproduktion über der gesamten Rinde innerhalb von 7 min bereits auf $^1/_3$ abgesunken und blieb in der Folge über Stunden konstant auf diesem Wert. Die Frequenzanalyse (Abb. 3) lieferte folgende Ergebnisse: Während der normalen Tätigkeit herrschte an einer bipolaren, weiten fronto-occipitalen Ableitung eine ziemlich gleichmäßige Frequenzverteilung, bei welcher vor allem die Tätigkeit im unteren Teil des Frequenzbandes überwiegt; am meisten vertreten waren Frequenzen um 3 und 4 Hz. Die Erhebung bei 12—14 Hz, die der frontalen Spindeltätigkeit entspricht, kommt weniger deutlich zum Ausdruck, weil diese Spindeln diskontinuierlich auftreten.

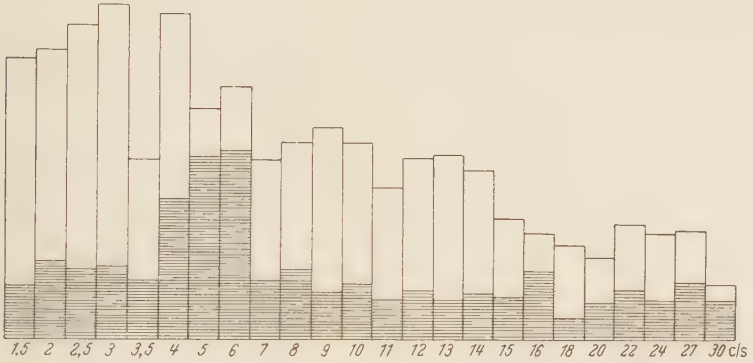


Abb. 3. Frequenzanalyse vor (weiße Balken) und 20—30 min nach 5 mg/kg Apomorphin i.m. (schraffierte Balken). Während vor Apomorphin die langsame Tätigkeit um 3—4 Hz im Vordergrund steht, findet sich das Frequenzmaximum unter Apomorphin bei 5—6 Hz

Während der ausgeprägten Apomorphinwirkung ist außer der Reduktion auf $^1/_3$ der Spannung noch ein deutliches Frequenzmaximum bei 5 –6 Hz zu erkennen; die Tätigkeit dieser Frequenz dominiert — wie bereits erwähnt — über der Area parietalis und striata.

3—4 Std nach der i.m. Apomorphininjektion (4—5 mg/kg) waren im EEG wieder Normalisierungserscheinungen zu erkennen, die vor allem in dem Wiederauftreten von frontalen Spindeln und langsamen Wellen zum Ausdruck kamen.

Das EEG während der voll ausgeprägten Apomorphinwirkung war durch kein Merkmal von jenen EEG-Veränderungen zu unterscheiden, die jeweils am gleichen Versuchstier vor der Apomorphininjektion durch verschiedene Reize (z. B. passive Beugung und Streckung einer hinteren Extremität, Azetongeruch u. dgl.) — allerdings das Ende des Reizes nur kurz überdauernd — ausgelöst werden konnten. Da auf Grund dieser Übereinstimmung angenommen werden konnte, daß die unter Apomorphinwirkung auftretenden EEG-Veränderungen durch eine Erregung des ascendierenden retikulären Systems zustande kommen, wurden in

einer weiteren Versuchsreihe Durchtrennungen des Stammhirnes in verschiedener Höhe teils vor der Apomorphininjektion, teils zum Zeitpunkt der voll ausgeprägten Apomorphinwirkung ausgeführt. In Abb. 4 sind die durchgeführten Durchtrennungen sowie ihr Effekt auf die Apomorphinwirkung schematisch wiedergegeben. Wie Abb. 4 zeigt, konnte die Apomorphinwirkung auf das EEG durch Durchtrennungen in der Höhe der vorderen Vierhügel aufgehoben werden, während Durchtrennungen in der Höhe der hinteren Vierhügel oder caudal davon die Apomorphinwirkung auf das EEG weder aufzuheben noch zu verhindern imstande waren. Wurde eine Durchtrennung im Bereich der vorderen Vierhügel zum Zeitpunkt der voll ausgeprägten Apomorphinwirkung durchgeführt, so traten im EEG nach der Durchtrennung frontal hohe Spindeln und langsame Wellen auf. Durchtrennungen im Bereich der vorderen Vierhügel waren auch dann wirksam, wenn schmale basale und laterale Randpartien in der Durchtrennungsebene intakt geblieben waren. In einem Versuch wurde nach dem Einsetzen der Apomorphinwirkung zuerst eine Durchtrennung hinter den hinteren Vierhügeln und 30 min später eine solche in der Höhe der Mitte der vorderen Vierhügel ausgeführt. Abb. 5 zeigt die völlige Wirkungslosigkeit der ersten Durchtrennung und die deutliche EEG-Beeinflussung durch die zweite, vordere Durchtrennung. Bemerkenswert an diesen Durchtrennungsversuchen scheint die Tatsache zu sein, daß zwischen dem am weitesten rostral geführten, eben noch nicht wirksamen Schnitt einerseits und dem am weitesten caudal geführten, eben noch wirksamen Schnitt andererseits nur ein schmaler Bereich von etwa 2 mm Breite liegt.

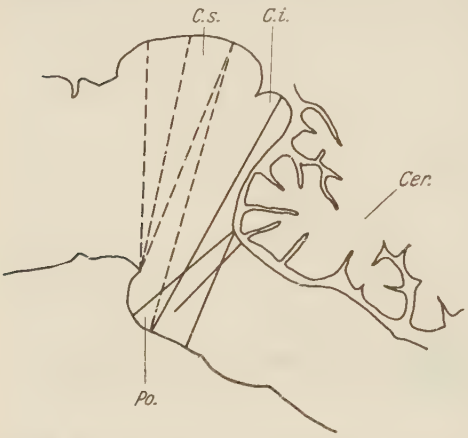


Abb. 4. Schematische Darstellung der durchgeführten Hirnstammdurchtrennungen. Ausgezogene Linien: Durchtrennungen, die die Apomorphinwirkung nicht beeinflussen; unterbrochene Linien: Durchtrennungen, die die corticale Desynchronisation unter Apomorphin aufheben bzw. verhindern. — *C.s.* vordere Vierhügel, *C.i.* hintere Vierhügel, *Cer.* Kleinhirn, *Po.* Brücke

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, ob Substanzen, die imstande sind, die auf elektrische Reizung des ascendierenden retikulären Systems auftretenden EEG-Veränderungen aufzuheben, auch eine antagonistische Wirkung gegenüber den durch Apomorphin ausgelösten EEG-Veränderungen entfalten. Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden

folgende Substanzen getestet: Atropinum sulfuricum (2 mg/kg), Scopolaminum hydrobromicum (0,2 mg/kg), Largactil (5 mg/kg), Evipan-Natrium (30 mg/kg). Außerdem wurde auch der Einfluß von Myanesin und Myoscain (50 mg/kg) untersucht. Wurden Lösungen dieser Substanzen in der angegebenen Dosierung zum Zeitpunkt der maximalen Apomorphinwirkung i.v. injiziert, so trat unmittelbar nach der Injektion eine Amplitudenzunahme und Frequenzabnahme auf, und das EEG zeigte

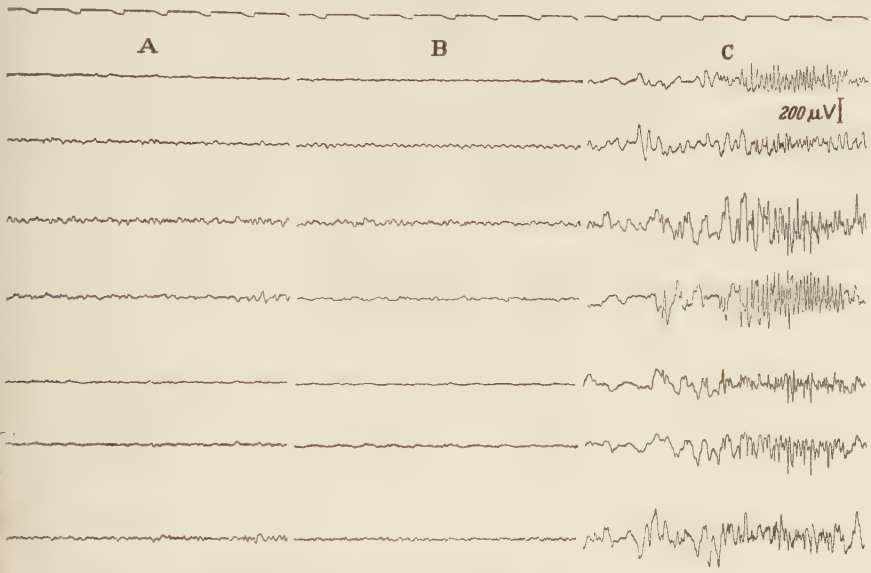


Abb. 5. Kaninchen-EEG. A: 18 min nach 5 mg/kg Apomorphin i.m. B: nach erfolgter Durchtrennung hinter den hinteren Vierhügeln (20 min nach Apomorphin). C: nach erfolgter Durchtrennung in der Höhe der Mitte der vorderen Vierhügeln (50 min nach Apomorphin). Ableitungen wie in Abb. 1 A u. B

wenige Minuten später im allgemeinen die für die betreffende Substanz charakteristischen Merkmale. Abb. 6 zeigt als Beispiel die Aufhebung der Apomorphinwirkung durch Scopolamin. Auf die Veränderungen des Evipan-EEG durch vorherige Apomorphinapplikation wurde bereits in einer früheren Arbeit (Brücke u. Mitarb.) hingewiesen.

Diskussion

Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß Apomorphin beim Kaninchen EEG-Veränderungen bewirkt, die sich von einer „arousal reaction" in keiner Weise unterscheiden. In den corticalen Ableitungen waren alle jene Charakteristica zu finden, die von anderen Autoren als für die „arousal reaction" typisch beschrieben wurden (Ectors; Longo, Berger u. Bovet; Rinaldi u. Himwich, 1955a u. c). In gleicher Weise ist die unter Apomorphin im Hippocampus auftretende hohe 5—6 Hz-Tätigkeit

ein charakteristisches Merkmal der „arousal reaction". Green u. Arduini konnten zeigen, daß eine durch verschiedenste Reize oder durch elektrische Reizung des ascendierenden reticulären Systems ausgelöste Desynchronisierung im Neocortex immer mit dem Auftreten von hohen, langsamen, sinusförmigen Wellen im Hippocampus vergesellschaftet ist. Die Autoren sprechen von einer „spezialisierten paleocorticalen arousal

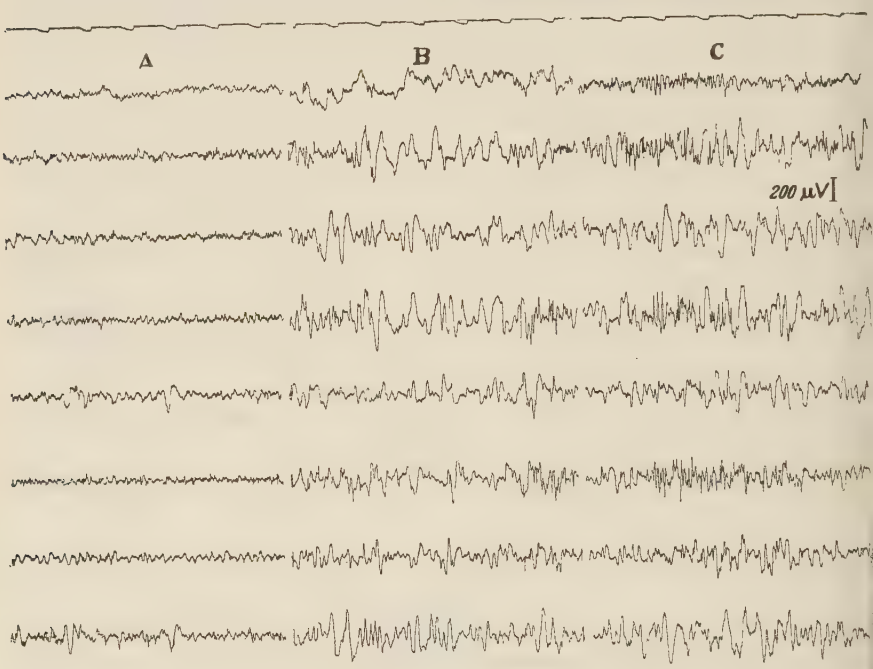


Abb. 6. Kaninchen-EEG. A: 2 min nach 0,4 mg/kg Apomorphin i.v. B: unmittelbar nach zusätzlicher Verabreichung von 0,2 mg/kg Scopolamin i.v. C: unmittelbar nach neuerlicher Verabreichung von 0,8 mg/kg Apomorphin i.v. (10 min nach Scopolamin). Ableitungen (von oben nach unten): (1) Linker Bulbus olfactorius, (2—8) wie Ableitungen (1—7) in Abb. 1A und B. Zeitschreibung in Sekunden. — C zeigt die Schutzwirkung von Scopolamin selbst gegenüber einer im Vergleich zu A verdoppelten Apomorphindosis

reaction", die über Bahnen ausgelöst wird, welche, von ascendierenden retikulären System kommend, über Septum und Fornix den Hippocampus erreichen.

Moruzzi u. Magoun konnten 1949 zeigen, daß elektrische Reizung des ascendierenden reticulären Systems EEG-Veränderungen bewirkt, die als „arousal reaction" bezeichnet werden. Zahlreiche Beobachtungen in neuerer Zeit haben jedoch ergeben daß gleichartige EEG-Veränderungen auch durch die Einwirkung verschiedener Substanzen zustandekommen können. Bisher konnte für folgende Substanzen eine derartige Wirkung nachgewiesen werden: Adrenalin (Porter; Bonvallet u. a.; Hiebel Bonvallet, Huve u. Dell), Ephedrin (Bremer, 1936), Amphetamin (Hiebel, Bonvallet, Huve u. Dell; Bradley; Bradley u. Elkes,

1953 a; Elkes u. a.; Rinaldi u. Himwich, 1955 a), Lysergsäurediäthylamid (Bradley u. Elkes, 1953 a; Elkes u. a.; Bradley), Meskalin (Rinaldi u. Himwich, 1955 b), α-2-Piperidyl-benzhydrol (Pipradrol, Meratran) (Rinaldi u. Himwich, 1955 a), Inhalationsnarkotica im Anfangsstadium der Narkose (Adrian u. a.; Schneider u. a.; Rossi u. a.), N-Allyl-Dromoran (Lévorphane) (Gangloff u. a.), Reserpin (Rinaldi u. Himwich, 1955 a, 1955 d), Anticholinesterasen wie Physostigmin (Funderburk u. a.; Bradley; Bradley u. Elkes, 1953 b; Elkes u. a.) und Diisopropylfluorophosphat (Funderburk u. a.; Wescoe u. a.; Bradley, Cerquiglini u. Elkes; Elkes u. a.; Rinaldi u. Himwich, 1955 a), sowie in die Carotis injiziertes Acetylcholin, Succinyl-bis-cholin, Tetramethylammonium und Dekamethonium (Longo, 1955). Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß auch Apomorphin der Reihe dieser Substanzen zuzurechnen ist.

Es muß jedoch beachtet werden, daß Substanzen, die eine corticale Desynchronisierung bewirken, ihren Angriffspunkt in ganz verschiedenen Anteilen des ZNS haben können, bzw. daß das Bild einer corticalen Desynchronisierung durchaus nicht immer durch eine primäre Erregung des ascendierenden retikulären Systems zustande kommen muß. Insbesondere Bradley, Bradley u. a. und Elkes u. a. haben wiederholt auf derartige Wirkungsunterschiede hingewiesen. Nach diesen Autoren bleibt z. B. die Wirkung von Diisopropylfluorophosphat und Physostigmin auf das EEG auch am encéphale isolé und am cerveau isolé (nach Bremer, 1938) erhalten, während die Amphetaminwirkung durch Mittelhirndurchschneidung und die Lysergsäurediäthylamid-Wirkung durch Durchschneidung in der Höhe des I. Halswirbels aufgehoben wird. Von diesen Substanzen scheint somit nur Amphetamin durch eine direkte Erregung des ascendierenden reticulären Systems auf das EEG zu wirken.

Im Gegensatz dazu behaupten allerdings Rinaldi u. Himwich (1954 a, 1954 b, 1955 a), daß cholinerge Substanzen eine direkte Erregung des ascendierenden reticulären Systems bewirken. In eigenen Versuchen haben wir jedoch – in Übereinstimmung mit Bradley, Bradley u. Elkes (1953 b) und Elkes u. a. — feststellen können, daß die Physostigminwirkung auf das ECG durch Mittelhirndurchtrennung in der Höhe der vorderen Vierhügel (die die Apomorphinwirkung komplett aufhebt) in keiner Weise beeinflußt wird. Man könnte sich allerdings vorstellen, daß Physostigmin auf die am weitesten rostral gelegenen Areale des ascendierenden reticulären Systems wirkt, deren Verbindungen mit dem Cortex durch die genannte Durchtrennung nicht unterbrochen werden.

Hiebel, Bonvallet, Huve u. Dell konnten ferner zeigen, daß zwar Amphetamin und Adrenalin sehr ähnliche, aber nicht identische Angriffspunkte im ascendierenden reticulären System besitzen. Der am weitesten caudal liegende Schnitt, der eben noch eine Aufhebung der Adrenalinwirkung auf das EEG bewirkt, geht durch die Mitte der Vierhügelplatte zum rostralen Rand der Brücke; hingegen wird die Amphetaminwirkung erst durch etwa weiter rostral geführte Schnitte vollständig aufgehoben. Ein Vergleich dieser Versuchsergebnisse mit unseren Befunden zeigt nun, daß Apomorphin und Adrenalin die gleichen Angriffspunkte im Mittelhirn

besitzen. Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß Hiebel, Bonvallet, Huve u. Dell und Bonvallet, Dell u. Hiebel ihre Befunde an Katzen erhoben haben, während wir Kaninchen als Versuchstiere verwendeten. Trotzdem drängt sich auf Grund der angeführten Tatsachen die Frage auf, inwieweit es sich bei der von uns gefundenen „Apomorphinwirkung" tatsächlich um eine primäre Wirkung von Apomorphin handelt. In diesem Zusammenhang ist eine Arbeit von Ko von Interesse. Dieser japanische Autor fand, daß Apomorphin (0,5—20 mg/kg s.c.) am Kaninchen eine Hyperglykämie auslöst, die durch Splanchnicusdurchschneidung abgeschwächt und durch Adrenalektomie aufgehoben werden kann. Es kann daher als gesichert angenommen werden, daß Apomorphin am Kaninchen eine Adrenalinausschüttung aus den Nebennieren verursacht und es wäre denkbar, daß die von uns gefundene corticale Desynchronisierung eine Folge dieser Adrenalinausschüttung ist.

In unseren Versuchen konnte die Apomorphinwirkung durch Atropin, Scopolamin, Largactil und Evipan, sowie durch Myanesin und Myoscain aufgehoben bzw. verhindert werden.

Für die vier erstgenannten Substanzen ist eine Hemmwirkung auf die Weckreaktion in zahlreichen Versuchen nachgewiesen worden (Atropin und Scopolamin: Wescoe u. a.; Funderburk u. a.; Bradley u. Elkes, 1953a; Elkes u. a., Longo 1956. — Largactil: Terzian, 1952, 1954; Hiebel, Bonvallet u. Dell; Longo u. a.; Bradley u. Chance. — Barbiturate: Arduini u. a.; French u. a.; Domino; King).

Unklar ist allerdings der Antagonismus Apomorphin—Atropin. Nach Longo (1956) verhindert Atropin am Kaninchen die durch elektrische Reizung des ascendierenden reticulären Systems auslösbare „arousal reaction" (Scopolamin war in diesen wie auch in unseren Versuchen noch etwa 10mal stärker wirksam). Andererseits wird die durch Atropin hervorgerufene langsame Aktivität nach Bradley, Bradley u. Elkes (1953b), Bradley, Cerquiglini u. Elkes, und Elkes u. a. wohl durch Physostigmin und in die Carotis injiziertes Acetylcholin aufgehoben, nicht aber durch Amphetamin und Lysergsäurediäthylamid. Nach diesen Autoren besteht also gerade zwischen der Substanz, die das ascendierende reticuläre System erregt (Amphetamin), und Atropin kein Antagonismus.

Hingegen stimmt der Antagonismus Apomorphin – Largactil gut mit der Annahme überein, daß Apomorphin (entweder primär oder sekundär über eine Adrenalinausschüttung) das ascendierende reticuläre System erregt. Nach Bradley und Chance besteht nämlich auch zwischen Largactil und Amphetamin ein Antagonismus bezüglich der EEG-Veränderungen, nicht hingegen zwischen Largactil und Physostigmin.

Obwohl Myanesin und Myoscain praktisch keinen Einfluß auf die durch elektrische Reizung des ascendierenden reticulären Systems ausgelöste corticale Desynchronisierung haben (King; Domino), waren diese beiden Glycerinäther imstande, das Apomorphin-EEG kurzzeitig vollständig zu verändern. In den corticalen Ableitungen wurde die

hochfrequente niedrige Aktivität durch eine langsame hohe Tätigkeit ohne frontale Spindeln ersetzt. Eine Erklärung für diesen Antagonismus kann zur Zeit nicht gegeben werden.

Zusammenfassung

Die Wirkung von Apomorphin auf das Kaninchen-EEG wurde einer genaueren Analyse unterzogen.

1. Unter Apomorphin verändert sich das EEG im Sinne einer anhaltenden „arousal reaction".

2. Durch Durchtrennungen des Mittelhirns im Bereich der vorderen Vierhügel werden die normalerweise unter Apomorphin auftretenden EEG-Veränderungen verhindert bzw. zum Verschwinden gebracht. Weiter caudal ausgeführte Durchtrennungen haben keinen Einfluß auf das Apomorphin-EEG.

3. Atropin, Scopolamin, Largactil und Evipan, sowie Myanesin und Myoscain heben die durch Apomorphin ausgelöste corticale Desynchronisierung auf.

Aus den Versuchsergebnissen wird geschlossen, daß Apomorphin und Adrenalin weitgehend ähnliche Angriffspunkte im ascendierenden reticulären System haben. Möglicherweise ist die unter Apomorphin auftretende Adrenalinausschüttung Ursache der festgestellten EEG-Veränderungen.

Literatur

Adrian, E. D., and B. H. C. Matthews: J. of Physiol. **81**, 440 (1934). — Arduini, A., and M. G. Arduini: J. of Pharmacol. **109**, 76 (1953). — Bonvallet, M., P. Dell and G. Hiebel: Encephalogr. Clin. Neurophysiol. **6**, 119 (1954). — Bonvallet, M., P. Dell et A. Hugelin: J. de Physiol. **46**, 262 (1954). — Bradley, P. B.: EEG Congress 1953, p. 21. — Bradley, P. B., S. Cerquiglini and J. Elkes: J. of Physiol. **121**, 51 P (1953). — Bradley, P. B., and A. J. Change: J. of Physiol. **129**, 50 P (1955). — Bradley, P. B., and J. Elkes: J. of Physiol. **120**, 13 P (1953a); **120**, 14 P (1953b). — Bremer, F.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **122**, 460 (1936). — L'activité electrique de l'écorce cerébrale. Paris: Hermann 1938. — Brücke, F., H. Petsche, S. Sailer u. Ch. Stumpf: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 408 (1956). — Domino, E. F.: J. of Pharmacol. **115**, 449 (1955). — Ectors, L.: Arch. Int. Physiol. **43**, 267 (1936). — Elkes, J., C. Elkes and P. B. Bradley: J. Ment. Sci. **100**, 125 (1954). — French, J. D., M. Verzeano and H. W. Magoun: Arch. of Neur. **69**, 505, 519 (1953). — Funderburk, H. W., and T. J. Case: Encephalogr. Clin. Neurophysiol. **3**, 213 (1951). — Gangloff, H., u. M. Monnier: Helvet. physiol. Acta **13**, C 47 (1955). — Green, J. D., and A. A. Arduini: J. of Neurophysiol. **17**, 533 (1954). — Hiebel, G., M. Bonvallet et P. Dell: Semaine Hôp. **1954**, 30, n° 37. — Hiebel, G., M. Bonvallet, P. Huve et P. Dell: Semaine Hôp. **1954**, 30, n° 37. — King, E. E.: J. of Pharmacol. **116**, 404 (1956). — Ko, Chosei: Jap. J. med. Sci., Trans. IV. Pharmacol. **8**, 122 (1934). — Longo, V. G.: Experientia (Basel) **11**, 76 (1955). — J. of Pharmacol. **116**, 198

(1956). — Longo, V. G., G. P. Berger and D. Bovet: J. of Pharmacol. **111**, 349 (1954). — Marko, A., u. H. Petsche: Unveröffentlicht. — Monnier, M., et H. Laue: Helvet. physiol. Acta **11**, 73 (1953). — Moruzzi, G., and H. W. Magoun: Encephalogr. Clin. Neurophysiol. **1**, 445 (1949). — Porter, R. W.: Amer. J. Physiol. **169**, 629 (1952). — Rinaldi, F., and H. E. Himwich: Amer. J. Physiol. **179**, 665 (1954a). — Am. EEG Soc. Annual Meeting, Atlantic City, June 1954b). — Dis. Nerv. Syst. **16**, 133 (1955a). — Science (Lancaster, Pa.) **122**, 198 (1955b). — Arch. of Neur. **73**, 387, 396 (1955c). — Ann. New York Acad. Sci. **61**, 27 (1955d). — Rossi, G. F., and A. Zirondoli: Encephalogr. Clin. Neurophysiol. **7**, 383 (1955). — Terzian, H.: Rass. Neur. veget. **9**, 211 (1952). — Revue neur. **91**, 445 (1954). — Wescoe, W. C., R. E. Green, B. P. McNamara and S. Krop: J. of Pharmacol. **92**, 63 (1948).

Prof. Dr. F. Brücke, Pharmakologisches Institut der Universität, Wien

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 347—357 (1957)

National Institute for Medical Research, Mill Hill, N.W. 7

The Role of Potassium Ions and Amino Acid Anions in the Reaction of Denervated Ganglion Cells *

By
S. B. Gertner ** and H. Reinert

With 3 Figures in the text

(Eingegangen am 16. Januar 1957)

Of a number of ganglion blocking agents tested, only the methonium compounds failed to inhibit the stimulating action of acetylcholine on the perfused superior cervical ganglion of the cat, two weeks after section of the cervical sympathetic trunk, i.e., when degeneration of the preganglionic nerve endings had occured (Perry and Reinert, 1954). This altered response of the denervated ganglion to methonium compounds was called the "effect of denervation". When L-glutamate, L-aspartate or salts of other amino acids were added to the Locke's solution used for perfusion, it was found that the methonium compounds would now block the stimulation produced by acetylcholine (Perry and Reinert, 1955). "The effect of denervation" could also be simulated in the normal ganglion by perfusing with a modified Locke's solution lacking potassium ions.

When it was realized that the absence of potassium ions in the extracellular fluid of normal ganglia could produce an effect similar to that of chronic preganglionic denervation, it seemed highly likely that an alteration in intracellular potassium ion concentration might explain these observations. This hypothesis was thought probable because the "effect of denervation" could be reversed by glutamate and aspartate, which had been previously shown by Krebs and Eggleston (1949), to be capable of acting as potassium carrier in vitro in brain slices.

In this paper we describe in vivo experiments to ascertain the validity of this hypothesis. We have determined the potassium ion concentration of normal and denervated rabbit ganglia, which we believe to be a good reflection of intracellular potassium. In addition, different substrates added to the Locke's solution were assessed in their ability to affect the potassium ion concentration of denervated and normal ganglia, perfused with solutions deficient in potassium.

* In memoriam Professor Dr. W. Heubner.

** During tenure of a fellowship in the Medical Sciences administered by the National Research Council for the Rockefeller Foundation.

Methods

Two types of experiments were done, the first on cats, to determine the effect of various substrates on transmission in the superior cervical ganglion. Experiments of the second set were done on rabbits, to determine the potassium ion concentrations of the superior cervical ganglia under various conditions of perfusion. The method used for perfusion of the isolated superior cervical ganglion of the cat and rabbit was that of Feldberg and Gaddum (1934), and was essentially identical with that described by Perry and Reinert (1954). All substrates were brought to p_H 7.4 with either hydrochloric acid or sodium hydroxide. Any excessive amount of sodium due to the addition of sodium hydroxide was taken into consideration, and the sodium chloride concentration in the final Locke's solution was adjusted accordingly to normal levels. Additional substrates were always brought to p_H 7.4 and added to the Locke's solution at a concentration of 100 mg./100 ml. The purity of the amino acids was initially tested against standard amino acids on descending paper chromatograms in duplicate, with two different solvents.

For the potassium estimations 150 Himalayan rabbits were employed. The superior cervical ganglion of the rabbit is easily isolated and can be perfused in the same way as that of the cat. The separate topography of the superior cervical ganglion and the nodose ganglion in the rabbit, however, is of decided advantage for quick dissection and was the reason for choosing this animal. In all rabbits the cervical sympathetic trunks were cut bilaterally and exactly 28 days were left for degeneration of the preganglionic fibers and nerve endings. The rabbits were anaesthetized with urethane, 1.0 g./kg. given intraperitoneally, and at the end of the perfusion experiment the ganglion was dissected out, weighed on a 10 mg. torsion balance and transferred to a pyrex test tube. After addition of 0.5 ml. Analar nitric acid of a specific gravity of 1.42, the contents were boiled for 2 min. and then diluted with 10 ml. de-ionized water. The potassium ion concentration was determined by flame photometry. All values are expressed as micrograms potassium per milligram wet weight of ganglion and are means of between 5 and 12 single experiments, as indicated. Statistical analysis of the results was performed by means of Student's "t" test.

The composition of the Locke's solution per litre of solution was sodium chloride 9.0; potassium chloride 0.2; calcium chloride 0.2; sodium bicarbonate 0.3; glucose 20.0.

Results

I. Experiments on ganglionic transmission in the cat

The effects of amino acid anions in the absence of extracellular potassium ions. It was desirable to ascertain if the amino acids could reverse the "effect of denervation" in the absence of potassium ions in the perfusion fluid of the denervated ganglion. L-glutamate, L-aspartate or L-alanine was therefore added to a Locke's solution deficient in potassium ions and was subsequently used for perfusion of the ganglia. Under these conditions L-glutamate and L-aspartate still reversed the "effect of denervation" and 250 μg. of hexamethonium was still effective in inhibiting a subsequent dose of acetylcholine used to stimulate the ganglion (Fig. 1). The effect of these amino acids in reversing the "effect of denervation" was, however, considerably reduced in the absence of extracellular potassium ions, when compared to the denervated ganglion

perfused with Locke's solution containing adequate amounts of potassium. Although, in previous experiments with denervated ganglia, glutamate and aspartate were found to be the most potent of the amino acids in their action, in the experiments on denervated ganglia with Locke's solution containing no potassium ions they were comparable with the less active amino acids such as L-alanine, L-lysine, and D-amino acids (used in those previous experiments on denervated ganglia perfused with normal extracellular potassium ion concentrations). In the absence of

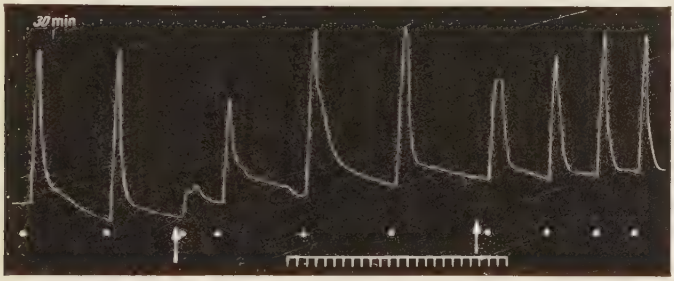


Fig. 1. Cat, urethane, chronically denervated superior cervical ganglion perfused with potassium ion free Locke's solution containing L-glutamate 100 mg./100 ml. Injections into perfusion stream. Contractions of nictitating membrane. At signals acetylcholine 10 μg. At arrows 250 μg. hexamethonium. Time signal 30 sec.

potassium ions in the perfusion fluid in denervated ganglia, L-alanine did not show any "activity" and the usual "effect of denervation" was still apparent, i.e., hexamethonium stimulated the ganglion and potentiated subsequent injections of acetylcholine.

The effects of compounds, other than amino acids. PERRY and REINERT (1955), in their paper on denervated ganglia noted in addition to the strange reversal of the action of hexamethonium by denervation, that the metabolism of denervated ganglia was apparently altered, since glucose was found to be no longer necessary for excitability. They suggested that, apart from restoration of the normal intracellular potassium ion concentration, the restoration of oxidative metabolism with the amino acids might be a possible explanation for the results obtained. If this is true, then the elements of the citric acid cycle, and those related or convertible to them, would be especially active in reversing the "effect of denervation". This would be so because these 'elements' would not need the acetate activating enzyme system to be metabolized directly into the tricarboxylic acid cycle and thus yield the energy necessary for the maintenance of ion gradients and normal excitability.

It was found in our experiments that, in the presence of oxalacetate, hexamethonium would partially inhibit acetylcholine stimulation in denervated ganglia to an extent similar to that due to the less active

amino acids, such as lysine and alanine. Succinate, however, reversed the "effect of denervation" completely, and the stimulation produced by acetylcholine was inhibited with hexamethonium (Fig. 2). L-glutamate, L-aspartate and succinate were found to be the most active compounds

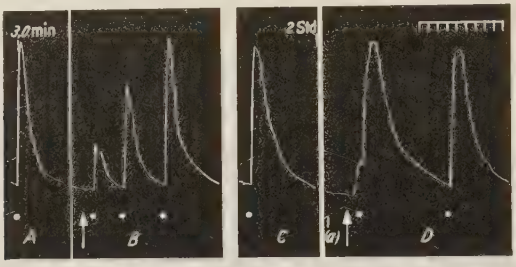


Fig. 2. Cat, urethane, chronically denervated superior cervical ganglion perfused with Locke's solution containing sodium succinate 100 mg./100 ml. Injections into perfusion stream. Contractions of nictitating membrane. At signals 10 μg. acetylcholine. Between A and B and between C and D cannula washed with several injections of 0.2 ml. Locke's solution until no further response obtained. At arrows 250 μg. hexamethonium. At (a) 0.2 ml. Locke's solution. A, 30 min. after beginning of perfusion. C, 2 hours after beginning of perfusion. Time signal 30 sec.

in reversing the "effect of denervation". Glutamine was less active, to about the same degree as alanine or D-glutamate.

Citric acid, L-ketoglutarate, glutarate, malate or cis-aconitate did not reverse the "effect of denervation". Citrate, malate, glutarate or cis-aconitate did, however, cause a most characteristic alteration in the response of the denervated ganglion to acetylcholine. The sensitivity of

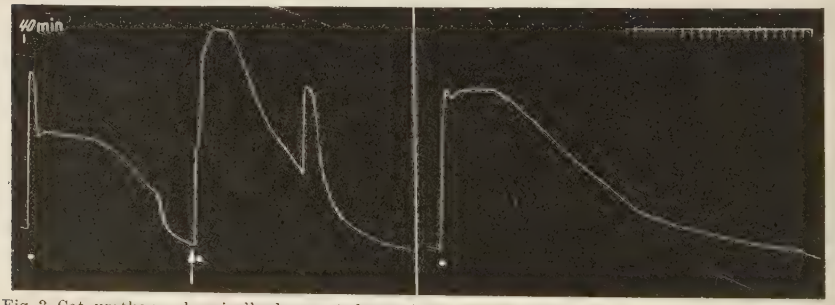


Fig. 3. Cat, urethane, chronically denervated superior cervical ganglion perfused with Locke's solution containing sodium citrate 100 mg./100 ml. Injections into perfusion stream. Contractions of nictitating membrane. At signals 10 μg. acetylcholine. At arrow 250 μg. hexamethonium. Time signal 30 sec.

the ganglion to acetylcholine was increased considerably, and there was produced an enormous contraction lasting up to 30 min. (Fig. 3). These prolonged contractions were maintained for considerable periods, but subsided finally. The ganglion cells became inexcitable after this, and perfusion with normal Locke's solution did not restore excitability. These

findings are similar to those described for normal ganglia under reduced extracellular calcium ion concentrations or in the presence of a very potent calcium chelating agent, such as phytic acid (Kewitz and Reinert, 1954). The similarity may in fact be based on the known calcium ion chelating properties of dicarboxylic and tricarboxylic acids, which could produce the same effect as a reduction in extracellular calcium ion concentration.

II. Rabbit superior cervical ganglia—Potassium determinations

It was desirable now to examine the potassium ion concentration of normal and denervated ganglia, freshly excised or perfused. Since our technique depended upon weighing the freshly removed ganglion, it was necessary to ascertain the percentage of water in normal and denervated ganglia. Each of the following Figures is the mean of 4 experiments. The *average weight* of the superior cervical ganglion of the rabbit was 5 mg. When dried to constant weight in an oven at 110° C. the normal ganglion lost 82% of its weight; the ganglion that had been perfused lost 81% of its weight. The chronically denervated ganglion, with its normal blood supply intact, lost 85% of its weight and the isolated perfused denervated ganglion 82% of its wet weight. Thus, neither denervation nor perfusion altered the dry-wet weight ratio of the ganglion and the differences found between normal and denervated ganglia in potassium per milligram wet weight of ganglion were certainly not due to changes in the fluid content of the ganglion after denervation. All subsequent values are expressed as micrograms potassium per milligram wet tissue.

Normal ganglia. The potassium ion concentration of normal ganglia was 3.88 ± 0.21 μg./mg. No statistically significant difference existed between the potassium ion concentration of ganglia with intact blood supplies and those isolated and perfused with Locke's solution for 30 min.

Perfusion for 30 min. with a Locke's solution lacking potassium ions reduced the potassium concentration to 1.69 ± 0.14 μg./mg., i.e. to about half that found under normal conditions. This was a highly significant difference.

Ganglia depleted of extracellular potassium, by an initial perfusion for 30 min. with a Locke's solution free of potassium ions, were then subsequently perfused for 30 min. with one of the solutions mentioned below, to determine whether or not the potassium level of these ganglia could be restored to their initial value:

a) normal Locke's solution,
b) normal Locke's solution plus 100 mg./100 ml. L-glutamate,
c) normal Locke's solution plus 100 mg./100 ml. D-glutamate,
d) normal Locke's solution plus 100 mg./100 ml. DL-aspartate.

It was found that the subsequent perfusion with normal Locke's solution for the period reported restored only partially the potassium that had been reduced by prior perfusion with a Locke's solution lacking potassium ions. Only L-glutamate and aspartate increased the potassium significantly when compared to normal Locke's solution (Table 1).

Table 1. *Potassium concentration of normal sup. cerv. ganglia of the rabbit in µg./mg. wet tissue where "n" equals number of ganglia*

	n	mean and its standard error
1. Normal blood supply	11	3.88 (0.21)
2. Perfused with Locke's solution	10	3.78 (0.32)
3. Perfused with Locke's solution free of potassium ions for 30 min.	10	1.69 (0.14)
4. Perfused as above, then for a further 30 min. with normal Locke's solution	11	2.12 (0.08)
5. As in (3), then for a further 30 min. with Locke's solution plus 100 mg./100 ml. L-glutamate	11	2.95 (0.29)
6. As in (3), then for a further 30 min. with Locke's solution plus 100 mg./100 ml. D-glutamate	4	2.14 (0.19)
7. As in (3), then for a further 30 min. with Locke's solution plus 100 mg./100 ml. DL-aspartate	6	2.51 (0.22)

Table 2. *Potassium concentration of normal sup. cerv. ganglia in µg./mg. wet tissue*

	n	mean and its standard error
1. Perfused for 30 min. with glucose-free Locke's solution	5	2.41 (0.32)
2. As above plus 100 mg./100 ml. L-glutamate	5	2.40 (0.10)
3. As in 1 plus 100 mg./100 ml. β-alanine	5	2.34 (0.15)

The potassium ion concentrations of normal ganglia were reduced when glucose was omitted from the perfusion fluid. L-glutamate or β-alanine added to the Locke's solution did not prevent this decrease in potassium observed when glucose was absent from the perfusion fluid (Table 2). Thus, it appears that these amino acids are not capable of replacing glucose in maintaining normal ion gradients, although they can maintain excitability and transmission in ganglia in the total absence of glucose in the normal ganglion.

Denervated ganglia. 28 days after section of the preganglionic nerve fibres the potassium concentration of the denervated ganglion was

significantly lower than that of the normal ganglion ($P = 0.01$). The potassium concentration of the denervated ganglion perfused with normal Locke's solution was significantly decreased ($P = 0.05$), compared with that of the denervated ganglion freshly excised. This was quite different from the normal ganglion, in which perfusion with normal Locke's solution did not lead to such a fall in potassium below that observed in

Table 3. *Potassium in chronically denervated sup. cerv. ganglia in µg./mg. wet tissue*

	n	mean and its standard error
1. Normal blood supply	10	2.94 (0.21)
2. Perfused with Locke's solution	9	2.28 (0.11)
3. Perfused as in (2) plus 100 mg./100 ml. L-glutamate	8	2.97 (0.33)
4. Perfused as in (2) plus 100 mg./100 ml. β-alanine	5	2.71 (0.17)
5. Perfused as in (2) plus 100 mg./100 ml. Na-succinate	5	3.34 (0.20)

the normal ganglion with an intact blood supply. Perfusion of the denervated ganglion, with Locke's solution containing L-glutamate as additional substrate, did not alter the potassium concentration, but with β-alanine a significant ($P = 0.02$—0.05) and with succinate a very marked increase ($P = 0.001$) in potassium occured. It is interesting to note that the denervated ganglion perfused with normal Locke's solution had a significantly higher potassium concentration than the normal ganglion perfused with a Locke's solution free of potassium ions ($P = 0.001$ to 0.01) (Table 3). The stimulating action of hexamethonium, however, and the potentiation of acetylcholine injected after hexamethonium is much more pronounced in denervated ganglia than in normal ganglia perfused with a Locke's solution free of potassium ions.

Discussion

In these experiments we have assumed a chemical and electrical similarity between rabbit and cat sympathetic ganglia. We have not actually tested the effects of different substrates on transmission in the rabbit ganglion. The evidence available from Larabee and Bronk (1952), Eccles (1935), and from Douglas and Ritchie (1956) would indicate no striking differences in electrical or chemical properties between rabbit and cat sympathetic ganglia and we have therefore assumed such a similarity in behaviour of the two ganglia.

Our experiments on rabbit superior cervical ganglia have shown that there is a statistically significant difference in potassium content between normal and denervated ganglia. This had been suggested before by Vogt

(1936), but definite experiments were not available until now. We believe that these differences in potassium content we have observed are a good reflection of intracellular potassium, for a number of reasons. As one would imagine from the high ratio of intracellular to extracellular potassium, we have found that the amounts of potassium in the extracellular fluid and the intravascular fluid in the ganglion could not be significant in our measurements when compared to the intracellular potassium, because of the observations that

1. The normal freshly excised ganglion and the one perfused both show the same concentration of potassium per milligram tissue, indicating that the amount of fluid in the vascular space of the ganglion is not great. If it were great, the potassium from the red blood cells remaining in the blood would raise the total potassium significantly. Thus the small amount of potassium in the fluid in the intravascular compartment is insignificant when compared with the total intracellular potassium and extracellular potassium.

2. The denervated ganglion perfused with Locke's solution, containing normal amounts of potassium, contains significantly less total potassium, indicating that the amount of extracellular potassium in the perfusing fluid and in the intravascular space is insignificant when compared with that of the intracellular potassium.

3. When glucose is omitted from the perfusion fluid the potassium falls, despite the presence of normal potassium in the extracellular fluid.

In effect we conclude that what we have measured is intracellular potassium, which we have found to be capable of change under various conditions of perfusion.

What are these changes and what do they suggest? In the normal rabbit ganglion first perfused with a Locke's solution lacking potassium ions, to simulate denervation, all except one of the substrates tested did not restore the potassium to normal levels after such treatment and only L-glutamate increased the intracellular potassium significantly. In denervated ganglia, however, glutamate did not restore potassium to normal levels, but β-alanine and succinate did increase potassium somewhat. The reversal of the "effect of denervation" was as complete with glutamate, however, as with succinate. There was no difference in the reaction to hexamethonium of the denervated ganglion with an intact blood supply, on the one hand, and those isolated and perfused, on the other, their intracellular potassium was, however, significantly different. It thus appears that there is no striking relationship between the potassium effects and the reversal of the "effect of denervation". None of the substrates could increase intracellular potassium to normal in the denervated ganglion. If the reactivation of enzyme systems inhibited by the lack of potassium were the explanation for the reversal of the "effect

of denervation", one might have expected this full restoration for the potassium gradients.

The loss of intracellular potassium ions caused by a glucose deficiency could not be prevented by L-glutamate or β-alanine. In the cat, however, synaptic transmission was unaltered when glucose was replaced by acetate, pyruvate or any of the amino acids mentioned. The maintenance of synaptic transmission and the maintenance of potassium ion gradients thus seem to be also independent phenomena. It can be argued, however, that glutamate and aspartate possess a more potent 'potassium carrier' function than other amino acids. This could mean that they promote the inward transfer of potassium "leaking out" of the ganglion cells in the absence of extracellular potassium ions. This assumed effect may be sufficient to restore the activity of inhibited enzyme systems and might not be reflected in a measurable increase of the intracellular potassium ion concentration. But our experiments do suggest that other mechanisms are involved than potassium ion transfer.

During the last few years a body of evidence has accumulated, Lewis (1952), to show that in invertebrate nerve glutamate and aspartate comprise about $^1/_2$—$^2/_3$ of the total anions present; in mammalian nerve and brain, Awapara, Landua and Fuerst (1950), the amounts of these anions are considerably less as is that of the total intracellular potassium. There seems to exist a mechanism by which glutamate, aspartate and alanine as negative ions are balanced ionically with potassium. From the biochemical point of view glutamate plays a highly active central role in metabolism, so that it does not seem rash to imagine that in nerve and ganglia it may occur in a very important pathway of metabolism. The fact that the amino acids found to be most active in reversing the "effect of denervation" are those amino acids found in highest concentration as anions in nerve seems to be more than coincidental. In fact it may be suggested that the fundamental defect in denervation is not a change in internal potassium, but a defect in oxidative metabolism resulting in a decrease or leakage of intracellular anions such as glutamate and aspartate, with a subsequent decrease in internal potassium. This would link the nerve cell with the known pathways of metabolism rather than nebulously through potassium. A point in favor of such an explanation is the fact that in our experiments, in the complete absence of potassium in the denervated ganglion, glutamate and aspartate still reversed the "effect of denervation", indicating that potassium was not important.

It is of interest to note that in skeletal muscle in potassium ion deficient rats, Iacobellis, Muntwyler and Dodgen (1956), a deficiency in intracellular anionic amino acids, such as glutamate and aspartate, has been noted. On the other hand, an increase in basic amino acids, such as lysine and arginine, was also evident.

The suggestion that the observed effects on transmission in sympathetic ganglia might be due to a calcium ion chelating action of the dicarboxylic-mono-amino acids can now be discarded, since citrate, malate, glutarate and cis-aconitate elicited the typical effects of a reduction of calcium ions in the perfusion fluid without altering the typical response of the denervated ganglion cell to hexamethonium. It is interesting to note that under anoxic conditions none of the substrates mentioned had any effect on denervated ganglion cells.

Hexamethonium produced in normal ganglia, under anoxic conditions, the same effect on acetylcholine stimulation as in denervated ganglia (Reinert, unpublished results).

It thus seems unlikely that a decrease in potassium or calcium ions is the primary cause of the "effect of denervation". It appears more likely from all these experiments that there are fundamental changes in the oxidative metabolism of the denervated ganglion cells. We suggested that certain metabolites, that apparently restore the ganglion to its normal state may have been absent, or present in reduced amounts, in ganglia denervated preganglionically.

Summary

1. In the denervated sup. cerv. ganglion of the cat, L-glutamate and L-aspartate still reverse the "effect of denervation" in the absence of extracellular potassium; L-alanine was without effect.

2. Certain metabolites, such as succinate, oxalacetate and glutamine, were found capable of reversing the "effect of denervation" in denervated ganglia.

3. In the presence of either citrate, L-ketoglutarate, glutarate, malate or cis-aconitate, acetylcholine causes a long lasting stimulation of the ganglion cells. These compounds do not reverse the "effect of denervation".

4. Denervated ganglia show significantly lower amounts of potassium than normal ganglia.

5. L-glutamate can significantly increase the intracellular potassium in normal ganglia depleted of potassium. In denervated ganglia it is without effect on potassium.

6. L-glutamate and β-alanine do not prevent the potassium loss of normal ganglia in the absence of glucose.

7. β-Alanine and succinate cause significant increase in intracellular potassium in denervated ganglia.

8. It is concluded that alterations in intracellular potassium and the effects of compounds in reversing the "effect of denervation" are not directly connected.

9. These factors are discussed in relation to certain suggestions about oxidative metabolism and anion transfer.

References

Awapara, J., A. J. Landua and R. Fuerst: Distribution of free amino acids and related substances in organs of the rat. Biochim. et Biophysica Acta **5**, 457—462 (1950). — Douglas, W. W., and M. Ritchie: The conduction of impulses through the superior cervical and accessory cervical ganglia of the rabbit. J. of Physiol. **133**, 220—231 (1956). — Feldberg, W., and J. H. Gaddum: The chemical transmitter at synapses in a sympathetic ganglion. J. of Physiol. **81**, 305—319 (1934). — Iacobellis, M., M. Muntwyler and C. L. Dodgen: Free amino acid patterns of certain tissues from potassium and/or protein deficient rats. Amer. J. Physiol. **185**, 275—278 (1956). — Kewitz, H., and H. Reinert: Differenzierung zwischen der Acetylcholinerregung und der Überträgerfunktion sympathischer Ganglien mit Hilfe verschieden zusammengesetzter Durchströmungsflüssigkeiten. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 315—322 (1954). — Krebs, H., and L. V. Eggleston: An effect of L-glutamate on the loss of potassium ions by brain slices suspended in a saline medium. Biochemic. J. **44**, 7 (1949). — Larabee, M. G., and D. W. Bronk: Metabolic Requirements of sympathetic neurons. Sympos. Quant. Biol., Cold Spring Harbor **17**, 245—266 (1952). — Lewis, P. R.: The free amino acids of Invertebrate nerve. Biochemic. J. **52**, 330—338 (1952). — Perry, W. L. M., and H. Reinert: The effects of preganglionic denervation on the reaction of ganglion cells. J. of Physiol. **126**, 101—115 (1954). — On the metabolism of normal and denervated sympathetic ganglion cells. J. of Physiol. **130**, 156—166 (1955). — Vogt, M.: Potassium changes in the stimulated superior cervical ganglion. J. of Physiol. **86**, 258—263 (1936).

Dr. H. Reinert, Glaxo Laboratories Ltd., Greenford, Middx./Engl., Dr. S. B. Gertner, Columbia University, College of Physicians and Surgeons, 630 West 168th Street, New York 32, N. Y., Department of Pharmacology

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 358—366 (1957)

Aus dem Physiologischen Institut der Universität, Heidelberg

Die Wirkung von Lysergsäure-Diäthylamid (LSD)* und Urethan auf die Tätigkeit eines sympathischen Ganglions**

Von

H. Broghammer, K. Takagi*** und H. Schaefer

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Januar 1957)

In der Reihe der psychisch wirksamen Substanzen, der Phantastica, Euphorica oder Eidetica (Hellpach) stellt Lysergsäure-Diäthylamid (LSD 25), besonders im Hinblick auf seine außerordentlich hohe Wirksamkeit[40], zweifellos einen der interessantesten Körper dar, der Anlaß zu vielseitigen Untersuchungen gab. Der Überblick über die gesamte bisherige Literatur zeigt, daß seit der Entdeckung der psychischen Wirksamkeit des LSD 25 durch Hofmann 1943 in mehreren Ländern diese Substanz sowohl chemisch als auch pharmakologisch und psychologisch-psychiatrisch intensiv geprüft wurde. Im Rahmen dieser Einleitung können lediglich die wichtigsten Untersuchungsergebnisse aus der relativ großen Zahl der Arbeiten (über 250) aus den verschiedenen Gebieten angeführt werden+.

LSD 25 ist chemisch das Amid der d-Lysergsäure mit einem sekundären Amin, ein Vertreter der Ergobasingruppe[20, 59]. Mit der geringsten Wirkungsdosis von 10—50 γ[42] steht es an der Seite der Hormone und der Vitamine. Es bewirkt an der Ratte Diuresehemmung, am Kaninchen Erregung von Darm und Uterus[35]. Bei Versuchen an Hunden und Katzen sah man Blutdrucksteigerung, motorische Starre und Tachykardie. Stoffe, die gegenüber LSD 25 antagonistisch wirken, sind die Barbiturate[55], Natrium-Amytal[55], Bernsteinsäure[37], Glutaminsäure[37], Pipradol[24], Diparcol[25]; die durch 5-Oxytryptamin verursachte Kontraktion am Rattenuterus wird durch LSD 25 ebenfalls gehemmt ([30, 31, 32, 56]). Als sensibelste biologische Nachweismethode erwies sich der Spinnentest (1949). Durch Untersuchungen mit radioaktiver Substanz[66] erhielt man Einblick in die Art der Körperverteilung von LSD 25[44, 60]. Bisherige Stoffwechseluntersuchungen erbrachten den Nachweis einer Störung der anaerobiotischen Phase des Glucosestoffwechsels[11, 47, 48, 37].

Die Wirkung am Menschen äußert sich etwa ½ Std nach Applikation der Substanz in vegetativen Krisen[17, 44, 46, 51, 53, 53a]. In einer darauffolgenden zweiten

* Delysid (Sandoz).

** Ausgeführt mit Mitteln der Rockefeller Foundation, New York.

*** Physiologisches Institut, Universität Nagoya (Japan); Stipendiat des Deutschen akademischen Austauschdienstes.

+ Eine Zusammenfassung einer größeren LSD-Diskussion ist veröffentlicht in „Neuropharmacology". Macy Foundation. Bd. 2.

Phase der Wirkung[53] entfaltet sich das sehr von der Individualität geprägte Rauschbild[8, 58]. Im Hinblick auf den diencephalen Charakter der Symptome — Affekt- und Antriebsstörungen, Depersonalisationserscheinungen[26, 53, 61, 62] — wurde das Rauschbild auch als eine Diencephalose bezeichnet. Das Ende der Rauschwirkung liegt etwa bei 3—5 Std nach Applikation. Es wurden sowohl die Störungen im afferenten Bereich als auch diejenigen der psychischen Funktionen von verschiedenen Autoren untersucht und differenziert[6, 7, 9, 20, 26, 46, 59, 58, 54, 62].

Neuerdings wurde auch über die Beeinflussung von Testverfahren durch den LSD-Rausch berichtet[1, 5, 13, 20, 38, 39, 10, 57] wodurch ein objektiver Einblick in den LSD 25-Rausch möglich war. Die Tatsache, daß im LSD 25-Rausch bewußte Erfahrungen mit dem eigenen Unbewußtsein möglich sind, gab Anlaß zu therapeutischer Anwendung bei Neurosen, Depressionen usw.[54].

In neueren Arbeiten befaßten sich einige Autoren besonders mit dem Einfluß des LSD auf die elektrische Aktivität im optischen System der Katze[23] sowie auf die Kreislaufreflexe[33, 37].

Unser Anliegen war, die objektive ganglionäre Wirksamkeit der Substanz zu untersuchen.

An 20 Katzen wurde der Einfluß der LSD auf die Tätigkeit des Ggl. stellare untersucht, um die vegetativen Wirkungen der LSD in ihren Elementarmechanismus aufzuklären.

Methode

Der Katze wird in Narkose (je nach Versuch durch Äther oder Urethan) der Brustkorb geöffnet, das Ggl. stellare mit seinen Ästen so weit wie nötig freigelegt, einer der zum Herzen ziehenden Nerven präpariert und vor jeder Anastomose mit dem Vagus peripher abgebunden. Registrierung mit Vor- und Hauptverstärker von Tönnies, mit dem Kathodenstrahl. Der Gang der künstlichen Atmung wird zugleich mit dem Blutdruck (kapazitives Druckmeßgerät eigener Konstruktion von Raule) auf einem Kymographion nach Hensel registriert.

Das Ganglion wird durch nahe intraarterielle Injektion mit der von Bronk, Tower, Solandt, Larrabee[14, 15, 16] beschriebenen Technik mit den zur Wirkung bestimmten Substanzen beschickt. Die normale Durchblutung bleibt dabei erhalten.

Bei der arteriellen Injektion ist es wesentlich, alle Arterien zu unterbinden. Wie wir fanden, geht noch relativ nahe an dem Abgang der A. subclavia nach hinten und unten eine Arterie ab, die später im Bogen nach oben verläuft und möglicherweise Blut ins ZNS bringt. Da diese Arterie in ihrem Verlauf erst relativ spät entdeckt wurde, läßt sich ein teilweise auch zentraler Angriffspunkt der injizierten Substanzen leider nicht ausschließen. Die Durchströmung des Ganglions durch die zur Injektion benutzte Arterie wurde durch Tuscheinjektion sichergestellt.

Ergebnisse

1. Einfluß des LSD auf die Spontantätigkeit. Bei postganglionärer Ableitung der spontanen Aktionsströme eines rein sympathischen Herznervenastes ist LSD ohne Einfluß oder hemmt, wenn es arteriell in das Ganglion injiziert wird (Abb. 1). Diese Wirkung fand sich bei allen Tieren, welche mit Urethan narkotisiert waren. Bei i.v. Injektion ist es meist unwirksam.

Da LSD wahrscheinlich eine vorwiegend zentrale aktivierende Wirkung hat, schien seine Unwirksamkeit bzw. Hemmung der zentral

ausgelösten sympathischen Spontantätigkeit überraschend. Es wurde daher vermutet, daß die Narkose einen Einfluß hat, zumal deren starke und differenzierte Wirkungen auf den Kreislauf noch durch jüngste Arbeiten erwiesen sind[2, 3, 11, 12]. Wir ersetzten daher die Urethan-Narkose durch eine Äther-Narkose. Bei diesen Tieren zeigte sich nun in der Tat eine Aktivierung der spontanen sympathischen Tätigkeit (Abb. 2) auf Dosen von 2—10 γ intraarteriell und 10—20 γ i.v. oder in eine Arterie des Beines. Diese Aktivierung tritt aber meist parallel mit einer Blutdrucksenkung auf, welche nach einer Latenz von etwa 20 sec gegen den Injektionsbeginn einsetzt. Diese Blutdrucksenkung kann in solchen Fällen die Zunahme der Aktionsströme bereits allein erklären, als sekundären Effekt. Bevor sie

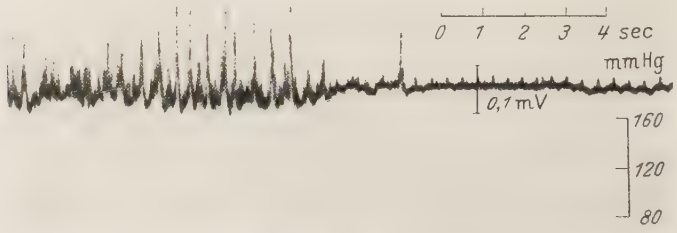


Abb. 1. Spontane Aktionsströme des N. cardiac. inf. (rein sympathischer Teil) der Katze. Zentrifugale Impulse während der Injektion von 30 γ LSD. Die Injektion beginnt am Anfang des Bildes. Totale Hemmung trotz etwas sinkenden Blutdruckes. Urethan-Narkose. 28. 1. 56. Oben Aktionsströme, unten Blutdruck. Nahe arterielle Injektion

einsetzt, ist sogar deutlich eine wenn auch geringe Hemmung der spontanen Impulse zu sehen. Die Ergebnisse stehen also am besten mit der Annahme in Einklang, daß die primäre Wirkung der LSD am Ganglion sehr klein ist und in einer schwachen primären Hemmung besteht.

Diese primäre ganglionäre Hemmung ist von einer Aktivierung gefolgt, die in vielen Fällen mit einer Blutdrucksenkung einhergeht und deshalb als rein sekundär erklärt werden könnte. Bekanntlich folgt ja die spontane Impulsaussendung sympathischer Ganglien dem Blutdruck, sinkt bei steigendem, steigt bei sinkendem Druck[4, 27]. Abb. 2 zeigt jedoch mit Deutlichkeit, daß auch in Fällen, wo diese Blutdrucksenkung ausbleibt, eine Aktivierung zustandekommt. Da sie eine lange Latenz hat (in Abb. 2 etwa 20 sec), wird sie mit größter Wahrscheinlichkeit einer *zentral* aktivierenden Wirkung der LSD entsprechen. Ganglionäre und zentrale Wirkung wären demnach antagonistisch. Die Aktivierung bei i.v. Injektion spricht im selben Sinn. Diese Aktivierung durch LSD der zentralen sympathischen Ganglien wird durch Urethan offenbar unterdrückt.

Wir fanden als Nebeneffekt, daß die Injektion kalter Versuchslösungen sowohl intraarteriell (bei hinreichender Menge) als auch i.v. starke Blutdrucksenkungen macht, welche leicht als spezifische pharmakologische Wirkung mißdeutet werden

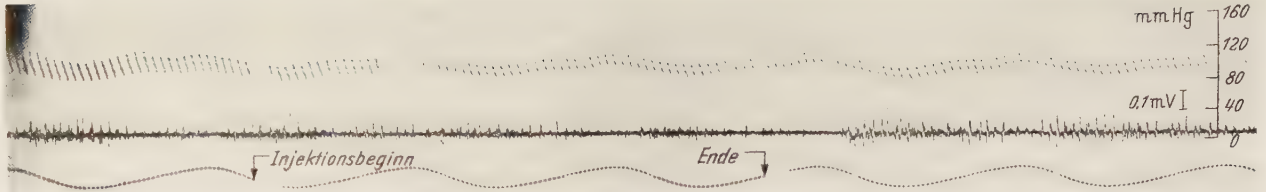


Abb. 2. Wie Abb. 1, doch statt Urethan- eine Äthernarkose. Blutdruck oben, Aktionsströme (spontan) Mitte, unten Atmung (Inspiration nach oben), mit Unterbrechung alle 1/4 sec. Nahe arterielle Injektion von 20 γ LSD. Erst Hemmung, dann Aktivierung. 14. 5. 56

Abb. 3. Interferenz von Urethan und LSD in ihrer Wirkung auf die spontanen efferenten sympathischen Aktionsströme. Oben Blutdruck, Mitte Aktionsströme, unten Atmung und Zeit (1/6 sec). Injektion von 10 γ LSD, nahe arteriell, wodurch Blutdruckabfall (reflektorisch?) und sekundäre Aktivierung der Aktionsströme zustande kommt. Nach 30 sec wird 0,3 cm³ Urethan (25%ig) ebenfalls nahe arteriell injiziert. Totale Hemmung. Beachte, daß die Hemmung noch bei Blutdrucken total ist, bei denen vor Urethan eine erhebliche Aktivität besteht. 16. 5. 56

können und die sekundär (nach altbekannten Beobachtungen*) eine Aktivierung des Sympathicus hervorrufen. Doch auch wenn dieser Effekt sorgfältig vermieden wird, bleibt eine Aktivierung durch LSD sichtbar.

2. Interferenz von LSD mit Urethan. Die Beobachtungen, daß LSD bei Urethan-Narkose wirkungslos ist, führte dazu, die Interferenz von LSD und Urethan genauer zu untersuchen. Urethan allein, bei naher intraarterieller Injektion 25%iger Lösung, hemmt immer die spontanen Aktionsströme fast ganz oder ganz (Abb. 3). Diese Wirkung tritt schon wenige Sekunden nach der Injektion ein. Wird der Urethan-Injektion eine ebenfalls nahe arterielle Injektion von LSD vorausgeschickt, so zeigt sich folgendes: ist das Intervall zwischen beiden Injektionen Null, d. h. wird Urethan und LSD in der gleichen Spritze gemischt und injiziert, so hemmt Urethan die Spontantätigkeit genau so wie ohne LSD. Auch ein Intervall von 30 sec hebt die Urethan-Hemmung noch nicht auf. *Folgt dagegen die Injektion des Urethan nach 1 min der Injektion von LSD, so hemmt Urethan kaum noch* oder doch erheblich weniger als ohne LSD. Verlängert man das Intervall zwischen LSD und Urethan-Injektion weiter, so tritt die Urethan-Hemmung immer deutlicher hervor. Nach 5 min ist Urethan noch wirkungslos, nach 8—10 min hemmt es wieder. Eine quantitative Auswertung ist dadurch ziemlich sinnlos, daß die Frequenz und Amplitude der Aktionsströme sich ändert. Man müßte also an Einzelfasern solche Versuche wiederholen, was bekanntlich beim Sympathicus derzeit noch ungewöhnlich schwierig ist. Wird LSD nach Urethan gegeben, so ist es vollkommen wirkungslos, bei naher arterieller Injektion beider Substanzen.

Während die Urethanwirkung selbst wohl recht unspezifisch erfolgt, da die injizierte Dosis bei naher arterieller Injektion naturgemäß hohe lokale Konzentrationen von Urethan erzeugt, kann die LSD-Wirkung nicht anders als hochspezifisch bezeichnet werden. Es wird ja durch 10 γ LSD in einem Versuch, der Abb. 3 genau entspricht, nur ein längeres Intervall zwischen LSD- und Urethan-Injektion aufweist, die Wirkung von etwa 75 mg (!) Urethan, also einer *7500fach größeren Urethanmenge*, gehemmt!

LSD ist also ein vollkommener Antagonist und Inhibitor der Urethan-Wirkung. Die Hemmung der Urethanwirkung erfolgt freilich nur, wenn LSD Gelegenheit hat, die Reaktionsstätten des Urethan vorher zu besetzen. Die Wechselwirkung ist offenbar kompetetiv. Die Reaktion des LSD erfolgt mit langsamerer Zeitkonstante als die des Urethans.

3. Beobachtung der ganglionären Übertragung. Um zu entscheiden, wieweit die synaptischen Vorgänge im Ggl. stellare selbst durch LSD und Urethan verändert werden, haben wir präganglionär mit einem Thyratrongerät gereizt und den

* Lit. bei [18].

ausgelösten Aktionsstrom postganglionär abgeleitet. Der Reizmoment steuert zugleich ein Kippgerät, welches darauf eine einmalige Zeitablenkung des Kathodenstrahls bewirkte.

Die Versuche stimmten mit den Beobachtungen an spontanen Aktionsströmen gut überein. LSD allein (20 γ) macht an der mit Urethan narkotisierten Katze anfangs eine geringfügige Hemmung, kenntlich an einer eben wahrnehmbaren Verkleinerung des Aktionsstromes. Bei Wiederholung des Versuchs erhöht LSD (40 γ) den Aktionsstrom ein wenig. In beiden Fällen wurde LSD in naher intraarterieller Injektion

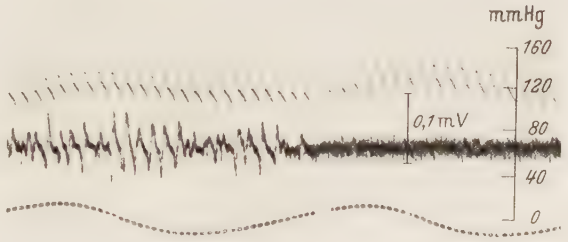


Abb. 4. Wirkung der Injektion von 1,0 cm³ 10% Na-Citrat in die A. subclavia, damit ins Ggl. stellatum Aktionsströme wie in Abb. 1. Bei der Unterbrechung der Atemkurve (unten) hat die Injektion eben begonnen. Sofortige Wirkung, bestehend in maximaler desynchroner Erregung. Nachfolgende reflektorische Blutdrucksenkung (nicht mehr wiedergegeben), die bei gleich hoher Dosis in einer Extremitäten-Arterie nicht auftritt. 14. 5. 56. Zeit in $^1/_6$ sec, der Atemkurve überlagert. Inspiration nach oben

appliziert. Urethan, nahe intraarteriell gespritzt, drosselt die Erregungsüberleitung sofort und für lange Zeit irreversibel, in einer Dosis von 0,6 cm³ der 25%igen Lösung. Wir dürfen daraus schließen, daß die am spontanen Aktionsstrom beobachteten Änderungen tatsächlich ganglionär bedingt sind.

Einige Kontrollen mit Mezkalin (10 —40 γ, nahe arterielle Injektion) anstelle von LSD zeigten immer eine Hemmung der ganglionären Übertragung.

4. Nebenbeobachtungen. Aus verschiedenen theoretischen Überlegungen heraus wurden einige Versuche angestellt, welche zu interessanten Einzelergebnissen führten, obgleich die Beobachtungen aus äußeren Gründen nicht definitiv weiter verfolgt werden konnten. Sie sollen deshalb hier nur kurz beschrieben werden.

a) Citratwirkung. Nahe arterielle Injektion von 1 cm³ 10% Na-Citrat in das Ggl. stellare führt zu einer enormen Aktivierung unter Aufhebung jeder Rhythmik und Verkleinerung aller Aktionsstromamplituden (Abb. 4). Eine gleiche Injektion in eine Arterie der unteren Extremität ist wirkungslos. Der Effekt findet also lokal im Ganglion statt. Er ist mindestens teilweise als osmotische Reizung aufzufassen. Die Bilder sehen so aus, als ob eine vorher bestehende Synchronisation, damit also auch Erhöhung der abgreifbaren Aktionsspannung, aufgehoben und durch eine maximale Desynchronisation der Tätigkeit aller Fasern ersetzt werde. Das Analogon der Zerstörung einer α-Tätigkeit im EEG durch Sinnesreize, bei Produktion von β-Wellen, drängt sich bei der Betrachtung der Abbildung auf.

b) Reflektorische Blutdrucksenkung durch LSD. Bei naher intraarterieller Injektion von 10—20γ LSD in einen Ast der Subclavia, von dem aus auch das Ggl. stellare zu erreichen ist, tritt regelmäßig eine starke Blutdrucksenkung auch dann auf, wenn eine Kontrollinjektion gleichwarmer Ringer-Lösung ohne Effekt auf den Blutdruck ist. Die regelmäßig wiederkehrende Blutdrucksenkung auf LSD bei naher arterieller Injektion läßt sich wahrscheinlich nur dadurch befriedigend erklären, daß LSD aus den Aortenreceptoren eine reflektorische Drucksenkung auslöst, indem es die Erregbarkeit dieser Receptoren steigert. Da die Aktionsströme des Depressor nicht registriert wurden, muß diese Deutung vorerst noch hypothetisch bleiben.

Besprechung der Ergebnisse

Die zunächst als sehr schwer deutbar erscheinenden Ergebnisse stimmen doch sehr gut mit folgenden einfachen Annahmen überein.

a) LSD hemmt die ganglionäre Übertragung bei direkter Einwirkung auf das Ggl. stellare schwach.

b) LSD ruft zentral eine Aktivierung hervor.

c) LSD ist trotz seiner direkten Hemmungswirkung ein Antagonist des Urethans für dessen ganglionäre Wirkung.

d) Urethan hemmt die ganglionäre Übertragung sehr stark.

Die beiden Hemmungswirkungen können nur dann antagonistisch sein, wenn Urethan die Membran verdichtet (Anelektrotonikum nach Fleckenstein[28]), LSD aber die verdichtende Wirkung des Urethans erschwert oder aufhebt. Es hat eine „protektive" Wirkung gegen den Urethan-Block, die mit langsamer Zeitkonstante einsetzt. Hierdurch ist LSD wirkungslos, wenn Urethan gleichzeitig oder sehr kurz nach LSD gegeben wird.

Diese protektive Wirkung steht freilich in einem eigenartigen Kontrast zu seiner direkten ganglionären Hemmung, welche experimentell absolut gesichert ist. Hier hätten weitere Experimente einzusetzen.

Insgesamt erweist sich also das LSD als eine vorwiegend zentral, nur wenig an peripheren sympathischen Ganglien angreifende Substanz.

Zusammenfassung

Lysergsäure-Diäthylamid (LSD 25) wird beim Ggl. stellare der Katze mittels naher arterieller Injektion appliziert. Es wirkt nur sehr schwach hemmend auf die spontanen Aktionsströme der efferenten sympathischen Nerven und auf die ganglionäre Übertragung bei künstlicher präganglionärer Reizung. Es ist jedoch ein starker Antagonist des Urethans, dessen komplette Blockwirkung am Ganglion bei intraarterieller Injektion es vollständig aufhebt, wenn es 1 min vor Urethan gegeben wird. Die Blockwirkung dauert etwa 8—10 min. Zeitlich nach Urethan ist LSD 25 wirkunglos.

Die erregenden Wirkungen des LSD sind offenbar nur zentral und nicht auch ganglionär.

Literatur

[1] Abramson, A. H., M. E. Jarvik et M. W. Hirsch: J. de Psychol. **39**, 455 (1955). — [2] Albers, C., W. Brendel u. W. Usinger: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 278 (1955). — [3] Albers, C., W. Brendel u. W. Usinger: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 125 (1956). — [4] Alexander, R. S.: Amer. J. Physiol. **143**, 698 (1945). — [5] Anderson, E. W., u. K. Rawnsley: Mschr. Psychiatr. **1954**, 38. — [6] Arnold, O. H., u. H. Hoff: Wien. Z. Nervenheilk. Bd. **6**, H. 2 (1953). — [7] Becker, A. M.: Wien. Z. Nervenheilk. **2**, 402 (1949). — [8] Benedetti, G.: Z. Psychother. **1**, 177 (1955). — [9] Blickenstorfer, E.: Arch. f. Psychiatr. u. Z. f. d. ges. Neur. **188**, 226 (1952). — [10] Boyd, E. S., E. Rothlin, J. F. Bonner, J. H. Slater and H. C. Hodge: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **113**, 6 (1955). — [11] Brendel, W., E. Koppermann u. R. Thauer: Pflügers Arch. **259**, 337 (1954). — [12] Brendel, W., E. Koppermann u. R. Thauer: Pflügers Arch. **259**, 357 (1954). — [13] Broghammer, H., u. K. Huhnstock: in Vorbereitung. — [14] Bronk, D. W., L. K. Ferguson, R. Margaria and D. Y. Solandt: Amer. J. Physiol. **117**, 237 (1936). — [15] Bronk, D. W., S. S. Tower, D. Y. Solandt and M. G. Larrabee: J. of Neurophysiol. **2**, 380 (1939). — [16] Bronk, D. W.: J. of Neurophysiol. **2**, 380 (1939). — [17] Busch, A. K., u. W. C. Johnson: Dis. Nerv. System **11**, 241 (1950). — [18] Cannon, P., W. Raule u. H. Schaefer: Pflügers Arch. **260**, 116 (1954). — [19] Clark, A. J.: General Pharmacology, in Heffters Handbuch exper. Pharm. 4. Erg.-Bd. Berlin 1947. — [20] Condrau, G.: Acta Psychiatr. (Københ.) **24**, 1 (1949). — [21] Duesberg, R., u. H. Spitzbarth: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **60**, 155 (1954). — [22] Etsten, B., and T. H. Li: J. Clin. Invest. **34**, 500 (1955). — [23] Evarts, V. E., W. Landau, W. Freygang and W. H. Marshall: Amer. J. Physiol. **182**, 594 (1955). — [24] Fabing, H. D.: Science **121**, 208 (1955). — [25] Fischer, R.: Experientia (Basel) **11**, 121 (1955). — [26] Fischer, R., F. Georgi u. R. Weber: Schweiz. med. Wschr. **1951**, 817. — [27] Fischer, Th., W. Raule u. R. Seraphin: Pflügers Arch. **262**, 72 (1955). — [28] Fleckenstein, A.: Der K-Na-Austausch. Berlin, Göttingen u. Heidelberg 1955. — [29] Frederking, W.: Psyche (Heidelberg) **7**, 342 (1953/54). — [30] Gaddum, J. H., and K. H. Hameed: Brit. J. Pharmacol. **9**, 240 (1954). — [31] Gaddum, J. H., D. J. Hathaway and F. Stephens: Quart. J. Exper. Physiol. **40**, 49 (1955). — [32] Gaddum, J. H.: J. of Physiol. **121**, 15 P. (1953). — [33] Ginzel, K. H.: J. of Physiol. **129**, 61 P. (1955). — [34] Ginzel, K. H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 149 (1956). — [35] Graham, J. D., u. A. Khalidi: zit. nach Ber. Physiol. **171**, 121 (1955). — [36] Heymans, C.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **29**, 72 (1953). — [37] Hoff, H., u. O. H. Arnold: Wien. Klin. Wschr. **1951**, 20, 66. — [38] Jarvik, M. E., H. A. Abramson, M. W. Hirsch et A. T. Ewald: J. de Psychol. **39**, 465 (1955). — [39] Jarvik, M. E., H. A. Abramson et M. W. Hirsch: J. de Psychol. **39**, 373 (1955). — [40] Jarvik, M. E., H. A. Abramson et M. W. Hirsch: J. de Psychol. **39**, 443 (1955). — [41] Kalkhoff, W.: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforsch. **1951**, 204. — [42] Katzenelbogen, S., u. Ai Ding Fang: Dis. Nerv. System. **14**, Nr. 3, S. 85 (1953). — [43] Koppermann, E., u. W. Brendel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 166 (1954). — [44] Lanz, N., E. Rothlin u. A. Celetti: Helvet. physiol. Acta **13**, 207 (1955). — [45] Lockett, M. F.: J. of Physiol. **112**, 243 (1951); **150**, 312 (1951). — [46] Mátefi, L.: Confinia neur. (Basel) **12**, 146 (1952). — [47] Mayer-Gross, W., W. McAdam and J. W. Walker: Nature **168**, 827 (1951). — [48] Mayer-Gross, W., W. McAdam u. J W. Walker: Nervenarzt **23**, 30 (1952). — [49] Palme, F.: Z. exper. Med. **113**, 415 (1943). — [50] Peters, H., P. N. Witt u. D. Wolff: Z. vergl. Physiol. **32**, 29 (1950). — [51] Rinkel, M.: J. Clin. Psychol. **12**, 42 (1951). — [52] Robertson, J. D., A. A. B. Swan and D. Whitteridge: J. of Physiol. **131**, 463 (1956). — [53] Rothlin, E.: Schweiz. med. Wschr. **1947**, 1161. — [53a] Rothlin, E., A. Cerletti, H. Konzett, W. R. Schalch u.

M. Taeschler: Experientia (Basel) **12**, 154 (1956). – [54] Sandison, R. A.: J. Ment. Sci. **100**, 419 (1954). – [55] Sandison, R. A., A. M. Spencer and J. D. A. Whitelaw: J. Ment. Sci. **100**, 491 (1954). — [56] Shore, P. A., S. L. Silver u. B. B. Brodie: Experientia (Basel) **11**, 272 (1955). — [57] Sloane, B., and J. W. Lovett Doust: J. Ment. Sci. **100**, 129 (1954). — [58] Stoll, W.: Schweiz. Arch. Neur. **60**, 279 (1947). — [59] Stoll, W., A. Hofman u. F. Troxler: Helvet. chim. Acta **32**, 506 (1949). — [60] Stoll, A., J. Rutschmann u. A. Hofmann: Helvet. chim. Acta **37**, 820 (1954). — [61] Walther-Buel, H.: Schweiz. med. Wschr. **1953**, 483. — [62] Weyl, B.: Diss. Freiburg/Br. (1954). — [63] Witt, P.: Experientia (Basel) **7**, 8 (1951). — [64] Witzleb, E.: Pflügers Arch. **257**, 244 (1953).

Prof. Dr. H. Schaefer, Physiologisches Institut der Universität Heidelberg

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 367—373 (1957)

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering A. G., Berlin-West

Die Beurteilung von Resorption und Ausscheidung der Gallekontrastmittel*

I. Mitteilung

Von

A. Harwart, K.-H. Kimbel und H. Langecker

(Eingegangen am 25. Januar 1957)

Die Ausscheidung der Gallekontrastmittel läßt sich aus der Untersuchung von Harn und Kot wegen der Abhängigkeit von der Darmpassage schwer beurteilen. Die Resorption ist auf diesem Weg überhaupt nicht zu übersehen. Versuche mit akuter Choledochus-Fistel sind durch Narkose und Operationsschock belastet, die Resorption und Sekretion stark beeinflussen. Diese Nachteile lassen sich durch Verwendung einer Dauer-Choledochusfistel bis zu einem gewissen Grad ausschalten, wie im folgenden am Beispiel der β-(4-Hydroxy-3,5-dijodphenyl)-α-phenyl-propionsäure (I) gezeigt wird. Hierzu wurde an Hunden vor und nach Anlegen einer Choledochus-Dauerfistel nach per os und i.v. Verabreichung von 100 mg/kg I als Na-Salz in 10%iger Lösung die Ausscheidung in Harn und Kot bzw. Galle verfolgt.

Methodik

Die Jodbestimmung erfolgte nach Clerc. Der Kot wurde mit 2,5 n Lauge 3 Std lang geschüttelt, zentrifugiert und in einem aliquoten Teil Jod bestimmt. In Zusatzversuchen wurden 100% I wiedergefunden. Extrahiert man einen nach I-Verabreichung gewonnenen Kot mit Lauge, so läßt sich weder durch nachträgliche Alkoholextraktion noch unter Verwendung von einem lipoiden Lösungsmittel bei verschiedenen p_H eine jodhaltige Substanz extrahieren. Da die Ca- und Mg-Salze der I gut löslich sind, können sie nicht zurückgehalten werden. Wir müssen daher annehmen, daß mit der Laugeextraktion alles erfaßt wird.

Als Dauerfistel benützten wir anfangs die von Rous u. McMaster angegebene Choledochusdrainage mit Glasolive und U-förmig ins Abdomen reichendem Gummischlauch. Da es jedoch durch Ausfallen von Gallebestandteilen leicht zur Verstopfung des Systems kam und ein großer Teil der Tiere an hämorrhagischer Enterogastritis einging, suchten wir eine Methode, die den dauernden Galleverlust vermeidet. Eine tägliche Verabreichung von Galle ersetzt nicht den Verlust.

An weiblichen kolpotomierten Hunden im Gewicht von 15—25 kg wurde in Pernokton-Narkose nach medianem Abdominalschnitt der D. cysticus unterbunden, die Gallenblase punktiert und durch eine Inzision des D. choledochus leberwärts ein PVC-Schlauch (d = 2,5 mm) eingebunden. Ein zweiter PVC-Schlauch wurde in den distalen Choledochusabschnitt bis kurz vor den Sphincter

* Herrn Prof. Dr. Karl Junkmann zum 60. Geburtstag.

Tabelle 1. *Die Ausscheidung von β-(4-Hydroxy-3,5-dijodphenyl)-α-phenyl- bei i.v. und p.o.-*

Tier Nr.	Zeit in Std / Verabreichungsart	Prozent bezogen auf Ges.-Ausscheidung							
		1			2			4	
		Harn		Galle	Harn		Galle	Harn	
		vor	nach	nach	vor	nach	nach	vor	nach
108	i. v.					56	43	55	81
31	i.v.								
	i.v.							49	
	i.v.							51	
58	i.v.								
99	i.v.	18	13	15	41	22	38	55	62
	p.o.		2,4	2,4		14	14		24
	i.v.								57
	i.v.					38	32		63
12	i.v.	18	17	17	22	44	31	29	56
	i.v.	8	17	17	17	24	39	21	68
	p.o.		8,4	11		17	30		37
	p.o.		4,0	1,0		7	6,3		15
90	i.v.			26			53	57	52
	i.v.								77
	i.v.					56	46		92
94	i.v.	17	23	42	46	68	69	54	80
91	i.v.		0,8	40		—	62		67
98	i.v.	3,5			25			51	
	i.v.								
32	i.v.	6,8	18	47	27	43	82	59	66
103	i.v.	17	20	36	44	42	49	60	70
	i.v.		24	40		44	68		56
93	i.v.				32			47	
100	i.v.				29			44	
m	i.v.	12,7	16,6	31,1	31,6	44,7	51,0	48,6	67,6
ε		2,36	2,57	4,14	3,38	4,46	4,67	3,21	3,06

Oddi oder bis ins Darmlumen eingeführt. Bei Verwendung von Schläuchen angegebenen Durchmessers werden Verstopfungen des Systems vermieden bzw. lassen sie sich leicht durch Spülen beheben. Beide Schläuche wurden unter weiter Bogenführung durch die Bauchwand außerhalb der Operationswunde nach außen geleitet und durch ein über beide Enden geschobenes, größeres Schlauchstück kurzgeschlossen. Die Galle fließt zu diesem Zeitpunkt meist schon ins Duodenum ab. Verschluß der Bauchwunde wie üblich, zum Wundschutz nur Sulfonamidgel und Anlegen einer „Weste“ aus Leinen zur Sicherung der Drainage gegen Abfressen. Für den Versuch wurde der Kurzschluß der Drainage gelöst, der zum Duodenum

propionsäure (100 mg/kg) vor und nach Choledochus-Dauerfistel am Hund
Verabreichung

in Harn bzw. Galle				Ges. Ausscheidung in Prozent der Eingabe nach 72 Std						
4	24									
Galle	Harn		Galle	vor			nach			
nach	vor	nach	nach	Harn	Kot	Ges.	Harn	Galle	Ges.	Kot
73	82	93	92	19,9	48	67,9	32,8	61,1	93,9	2,1
	70			21,5	24,5	46,0				
	65			31,5	35,7	67,2				
	65			23,8	22,2	46,0				
	55			11,3	47,6	58,9				
61	68	89	91	29,5	32,4	61,9	13,4	61,4	74,8	1,9
23		71	68				16,5	66,9	83,4	6,0
57		90	97				26,9	60,3	87,2	7,0
49		83	84				34,0	54,3	88,3	2,9
77	48	94	97	27,4	32,8	60,2	42,0	36,3	78,2	0,6
73	50	95	98	32,3	18,3	50,6	41,6	34,1	75,7	2,3
52		72	93				15,6	64,9	80,5	7,9
23		59	94				29,6	78,9	108,5	—
83	93	94	98	28,7	30,0	58,7	24,0	58,6	82,6	0,9
79		89	97				25,8	69,1	95,0	0,5
82		94	98				26,7	74,7	101,4	1,7
77	71	92	98	13,0	70,2	83,2	28,4	26,2	54,6	0,6
88		95	99				19,3	41,2	60,5	1,4
	73			19,1	32,9	52,0				
	76			23,7	32,6	56,3				
87	81	97	98	19,1	38,5	57,6	20,1	65,4	85,5	2,5
77	79	97	98	13,7	52,4	66,1	25,4	31,3	56,7	1,3
89		93	98				13,3	63,6	77	4,4
	60			35,1	32,2	67,3				
	71			53,3	17,6	70,9				
75,1	69,1	92,5	95,9	25,2	35,4	60,6	26,7	52,7	79,4	2,15
3,19	3,01	1,0	1,11	2,58	3,45	2,43	2,36	4,11	3,83	—

führende Schlauch verschlossen und an die galleabführende Drainage eine Gummiblase gebunden. Um Zugwirkungen der gefüllten Gummiblase und Druck auf die Blase beim Legen des Tieres zu verhindern, wurde eine flache, einseitig offene, rechteckige Aluminiumkassette über Gummiblase und Drainage gedeckt und mit der „Weste" am Rumpf fixiert. Man konnte ohne Beeinträchtigung der Bewegungsfreiheit des Tieres die Galle 24 Std sammeln. Am Versuchstag wurde den Hunden getrocknete oder eingedickte Ochsengalle per os oder durch den duodenalen Drainageschenkel gereicht. Sie erhielten, wie die Normaltiere, 3 Std nach der I-Gabe Futter ad libitum.

Nachdem sich diese Methode bereits gut bewährt hatte, fanden wir bei McMaster u. Elman ein ähnliches Prinzip verwendet. Die von uns benützte Drainage bietet jedoch die sichere Gewähr der Vermeidung von Verstopfungen.

Zur Beurteilung der Leberfunktion solcher Hunde mit Choledochus-Dauerfisteln wurde im versuchsfreien Intervall der Bromsulfaleintest nach Rosenthal u. White durchgeführt (10 mg/kg BSP i.v., BSP-Bestimmung im Plasma nach 5, 15 und 30 min). Vergleiche mit Bestimmungen normaler Tiere zeigten keine Differenz, so daß die Leberfunktion der Tiere hinsichtlich BSP-Ausscheidung normal ist. Die Leber von getöteten Tieren war makro- und mikroskopisch normal.

Derart operierte Tiere konnten monatelang zu Versuchen verwendet werden.

Zur Bestimmung der Aktivität über verschiedenen Dünndarmabschnitten des Hundes wurde das Tier in Pernokton-Narkose laparotomiert und der Darm in Abschnitten von 10 cm mit einem bleiabgeschirmten Szintillationszähler in nahezu gleicher Geometrie in stündlichen Abständen gemessen. Die Bauchhöhle wurde zwischen den einzelnen Messungen verschlossen, der restliche Darm während der Messung mit warmen Kochsalzkompressen bedeckt.

Die fortlaufende Messung der Blutaktivität geschah in Pernokton-Narkose durch Einbinden eines Polyäthylenschlauches in das distale und proximale Ende der durchtrennten A. femoralis des heparinisierten Hundes. Die entstehende Schlauchschleife wurde durch ein Dreifachzählrohr geleitet und die Aktivität des durch den Schlauch fließenden arteriellen Blutes über ein anzeigendes Strahlungsmeßgerät mit Tintenschreiber fortlaufend registriert.

Die Eiweißbindung bestimmten wir durch Ultrafiltration unverdünnten Plasmas, das durch Zusatz von I auf einen Gehalt von 20 resp. 200 mg-% gebracht war. Die Kollodiumfilter (d = 9 cm) wurden unter Druck von 4 at N_2 gesetzt und das auslaufende Ultrafiltrat kubikzentimeterweise in 9 Proben gemessen.

In der Tabelle ist neben der Gesamtausscheidung in 72 Std ihre Aufteilung auf Harn und Galle nach 1, 2, 4 und 24 Std und zwar in Prozenten der Gesamtausscheidung in Harn bzw. Galle mit dem arithmetischen Mittel und ε dargestellt.

Daraus ersieht man:

1. Resorption. Diese Größe ist gerade für die perorale Anwendung sehr bedeutsam. Sie ist nur nach der Ausscheidung am Fisteltier zu beurteilen, da beim Normaltier die Kotanalyse nichts aussagt und die Rückresorption das Bild beeinflussen kann. In den ersten 4 Std ist die Ausscheidung von I in Harn und Galle bei p.o.-Gabe gegenüber den i.v. Versuchen deutlich verzögert. Die Gesamtausscheidung ist jedoch in allen Fällen gleich oder etwas größer als nach i.v. Gabe. Es ist demnach I beim Hund gut resorbierbar. Auch bei der Ratte kann man aus dem Verhältnis der LD 50 i.v./p.o., das 0,35 beträgt, eine besonders gute Resorption ableiten.

2. Rückresorption. Nach den Ergebnissen der folgenden Mitteilung wird I zu 66% unverändert in der Galle ausgeschieden. Es muß daher als solches auch rückresorbiert und wiederum in Harn und Galle anteilig ausgeschieden werden. Die Ausscheidung in der Galle ist zwar nach 4 Std nahezu beendet, die Rückresorption wird aber sicherlich mit einer zeitlichen Verzögerung einhergehen. Die Ausscheidungsgeschwindigkeit

im Harn ist beim normalen Hund nach 1, 2, 4 und 24 Std (12,7, 31,6, 48,6 u. 69,1%) kleiner als beim Fisteltier (16,6, 44,7, 67,6 u. 92,5%). In diesen Differenzen kommt die Rückresorption deutlich zum Ausdruck. Während das Fisteltier in 24 Std die Harnausscheidung nahezu beendet hat, braucht das normale Tier dazu 3 Tage. Die Gesamtausscheidung ist beim normalen Tier mit 25,2% gegenüber dem Fisteltier mit 26,7% etwas kleiner. Bei einer stärkeren Rückresorption sollte jedoch beim normalen Tier eine größere Gesamt-Harnausscheidung erwartet werden als beim Fisteltier. Wahrscheinlich ist beim Fisteltier die Gallesekretion nicht optimal, so daß die Harnausscheidung bevorzugt wird.

Bei einem Tier wurde die Radioaktivität 6 Std lang nach i.v. Injektion von 100 mg/kg I stündlich in situ über 12 verschiedenen Stellen des Dünndarms gemessen, um zu sehen, ob das vom Duodenum durch den Darm wandernde markierte I eine stärkere Abnahme zeigt oder eine zweite von rückresorbiertem und erneut sezerniertem I herrührende Welle radioaktiver Substanz auftritt. Beides war nicht zu beobachten. Bei einem 16 kg schweren Hund wurde nach i.v. Injektion von 100 mg/kg radioaktiv markierter I über einen Gefäßnebenschluß die Zerfallszahl im strömenden Blut fortlaufend registriert. Wir erhielten einen exponentiellen Abfall des I-Gehaltes und konnten während 5stündiger Beobachtung keinen erneuten Anstieg des Blut-I feststellen. Bei diesen beiden Versuchsanordnungen war allerdings während der Versuchszeit von 5—6 Std auch gar keine Rückresorption zu erwarten, wie durch folgenden Versuch gezeigt wird: Zwei normale, nüchterne Hunde gaben nach p.o.-Darreichung von 0,3 g/kg I röntgenologisch in den ersten 6 Std einen schwachen Gallenblasenkontrast. Danach erhielten sie Normalfutter ad lib. und 23 Std nach I-Gabe war ein deutlicher Gallenblasenschatten zu erkennen. (Zur Bestätigung bedarf es noch der Sicherung der Gallenblasenentleerung durch Hypophysin.) Nach unseren Versuchen muß man annehmen, daß die Ausscheidung in der Galle nach 8 Std beendet ist, so daß dieser 2. Schatten durch Rückresorption zustande kommen könnte. Crismer glaubte aus der geringen Harnausscheidung beim Fistelhund und der hohen beim Menschen nach I die Rückresorption erschließen zu können. Es ist jedoch ein Vergleich an verschiedenen Species nicht möglich. Pons beschreibt einen Fall, bei dem sich im Röntgenbild 12 Std nach peroraler Gabe von I das Bild einer normalen Gallenblase zeigte. Nach einer Boyden-Mahlzeit entleerte sich die Gallenblase in weiteren 4 Std völlig. Weitere Aufnahmen in 2 Std-Abständen ergaben 22 Std nach der Einnahme ein zweites, zwar nicht sehr kontrastreiches, aber immer noch als gut zu bezeichnendes Bild. Billion fand in einem Drittel seiner Versuche mit radioaktivem I zwischen der 8. und 12. Std einen zweiten Serumkonzentrationsanstieg, er läßt jedoch die Frage der Beteiligung der Rückresorption an diesem Phänomen offen,

weil eine Diureseabnahme den Konzentrationsanstieg im Blut bedingt haben könnte.

3. Ausscheidung im Harn. I wird gegenüber anderen enteral resorbierbaren Kontrastmitteln auch beachtlich im Harn ausgeschieden (26,7% ± 2,4). Dieser Harnanteil schwankt von Tier zu Tier ziemlich stark und bei Hund 99 und 103 sogar individuell. Vergleichende Untersuchungen an nüchternen und gefütterten Tieren ergaben keinen Anhaltspunkt für eine alimentäre Ursache dieser Schwankungen.

4. Ausscheidung in der Galle. Der für die Gallegängigkeit einer Verbindung bedeutsame Plasmatransport von I wird durch die hohe Plasmaeiweißbindung begünstigt. Nach Ultrafiltrationsversuchen mit 20 mg-% I durch Kollodiummembranen wurden beim Hund (4 Versuche) im Mittel 92,5%, beim Kaninchen (2 Versuche) 98,0% und bei der Ratte (2 Versuche) 90,5% gebunden. Nach Untersuchungen von Oeff wird von einem Molekül Serumalbumin maximal 1,85 Molekül I gebunden. Das Verhältnis von gebundenem zu ungebundenem I ändert sich mit der Konzentration, in den therapeutischen Konzentrationen überwiegt die eiweißgebundene Fraktion.

Die Ausscheidungsgeschwindigkeit in der Galle ist größer als im Harn. Nach 1 Std sind schon 32% I, nach 2 Std 50% ausgeschieden und nach 4 Std beträgt die Ausscheidung 75%. Die Ausscheidungsgeschwindigkeit bei den einzelnen Hunden ist sehr gleichmäßig.

5. Ausscheidung im Kot. Die Ausscheidung von I im Kot beim nichtoperierten Tier schwankt sehr erheblich. Es kommen Fälle vor, bei denen die Gesamtausscheidung zwischen 45 und 60% lag, bei normaler Harnausscheidung. Aus den methodischen Versuchen über den Nachweis von I im Kot ergab sich, daß man mit alkalischer Extraktion I quantitativ erfaßt, so daß man annehmen muß, daß beim Hund I gelegentlich länger im Körper verweilt. Auch Perlmann beobachtete beim Hund nach peroraler Gabe von β-(3-Amino-2,4,6-trijodphenyl)-α-äthylpropionsäure sogar Gesamtausscheidungen von nur 27—51%, aber eine Speicherung in Haut, Muskel und Leber. Wir haben daher für die Beurteilung der Ausscheidung am Normaltier die Kotausscheidung nicht in Betracht gezogen. Beim Fisteltier konnten wir nach i.v. Darreichung in 10 Versuchen eine geringe I-Ausscheidung feststellen (2,3%).

I wird beim Hund gut resorbiert, in der Galle rasch ausgeschieden, auch beachtlich im Harn. Der großer Anteil freier I in der Galle gibt Anlaß zur Rückresorption, die sich in verzögerter Harnausscheidung während der ersten 24 Std sowie in einem zweiten Kontrast nach 24 Std bemerkbar macht. Das Fehlen einer größeren Gesamtausscheidung im Harn beim Normaltier gegenüber dem Fisteltier muß wohl auf eine gewisse Beeinträchtigung der Ausscheidung durch die Galle beim Fisteltier zurückgeführt werden. Das könnte damit zusammenhängen, daß

am Versuchstag die physiologischen Verhältnisse durch Unterbindung des Galleflusses zum Darm gestört sind. Der Ersatz durch Fremdgalle ist keine befriedigende Lösung. Die physiologische durch Sekretin ausgelöste Cholerese wird durch den enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren aufrechterhalten. Ein zweiter Faktor könnte evtl. die Ausschaltung der Gallenblase sein, deren Kontraktion sicher zum Sekretionsmechanismus in Beziehung steht.

Für *feinere* Beurteilung von Resorption und Ausscheidung müßte eine stärkere Angleichung an physiologische Verhältnisse angestrebt werden, mit einer Technik, die bei erhaltener Gallenblase und Sphinctertätigkeit im geschlossenen System Durchströmungs- und Konzentrationsbestimmungen gestattet.

Summary

On the example of β-(4-Hydroxy-3,5-dijodphenyl)-α-phenylpropionic-acid we have investigated the absorption, reabsorption and excretion of a cholecystographic agent in normal dogs and dogs with permanent choledochus fistula. But also by permanent fistulated dogs we have not seen the optimum of excretion in bile. We have made a discussion of the mistakes of such investigation and what could be done to exclude these.

Frl. V. Beyer, Frl. R. Lendorff und Herr N. Sprzagala haben bei der Arbeit wertvolle Hilfe geleistet.

Literatur

Billion, H.: Dtsch. med. J. **1954**, 214. — Clerc, E.: Ärztl. Wschr. **1955**, 1156. — Crismer, R.: Arch. internat. Pharmacodynamie **72**, 138 (1946). — McMaster, P. D., and R. Elman: J. Exp. Med. **41**, 513 (1925). — Oeff, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 523 (1954). — Perlman, P. L., R. E. Kosinski and D. Sutter: J. Amer. Pharmaceut. Assoc., Ed. **44**, 69 (1955). — Pons, H.: Presse méd. **1945**, 679. — Rosenthal, S., and E. C. White: J. Amer. Med. Ass. **84**, 1112 (1925). — Rous, P., and P. D. McMaster: J. Exp. Med. **37**, 11 (1923).

Prof. Dr. Hedwig Langecker, Hauptlaboratorium der Schering A. G., Berlin N 65, Müllerstr. 170—172

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 374—377 (1957)

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering AG. Berlin-West

Das Schicksal der β-(4-Hydroxy-3,5-dijodphenyl-)-α-phenylpropionsäure im Organismus des Hundes*

Von

H. Langecker und Ch. Ertel

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 25. Januar 1957)

Obgleich β-(4-Hydroxy-3,5-dijodphenyl-)α-phenylpropionsäure (I) schon lange als Gallekontrastmittel mit Erfolg verwendet wird, ist über ihr Schicksal im Organismus nur wenig bekannt geworden. Da für die Beurteilung von Resorption und Ausscheidung solche Kenntnisse wichtig sind, haben wir beim Hund untersucht, ob in Harn und Galle neben unveränderter I auch Metabolite auftreten. Dies war zu erwarten, da von Phenolcarbonsäuren (Schmidt) sowie vom Thyroxin (Roche) Konjugation an Glucuronsäure beschrieben worden ist.

Für die Erfassung von I in Harn und Galle wurde die Jodbestimmung nach Clerc verwendet. Zur Abtrennung diente ihre Ätherlöslichkeit bei p_H 4, in der Galle nach Entfernen des Schleims durch Alkoholfällung und der Phospholipoide durch Benzol (Hinsberg). In Zusatzversuchen zu Harn und Galle wurde I 90—100%ig wiedergefunden. Für die Reindarstellung mußte in der Galle die chromatographische Trennung nach Griessmann ausgeführt werden. Dabei läßt sich I in den ersten 3 Soda-Eluaten schmelzpunktrein gewinnen.

Nach I-Verabreichung konnte aus dem Ätherextrakt (p_H 4) von Harn und Galle die Säure nach Umkristallisieren aus Benzol mit einer Ausbeute von 30% isoliert werden. Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt, Jodgehalt stimmten mit I überein. Nach Verabreichen von I tritt eine bei p_H 4 nicht ätherlösliche Fraktion auf (Spalte 2, 3 und 4 d. Tab.). Auch die gute Löslichkeit des Bariumsalzes der I läßt sich zur Trennung benützen. Nach Verabreichung von I findet man im Harn eine bariumfällbare, jodhaltige Verbindung (Spalte 2). Es ist jedoch der ätherunlösliche Anteil nicht vollständig bariumfällbar, wohl aber butanollöslich (Spalte 3 und 4). Die der unveränderten I in Harn und Galle entsprechende Fraktion nahm sowohl nach Säurehydrolyse (1 Std Rückfluß, 5 n Schwefelsäure) als auch nach Inkubation mit β-Glucuronidase (17 Std p_H 5, 37°) um 40—50% zu (Spalte 1a u. 1b). Es treten

* Herrn Prof. Dr. Karl Junkmann zum 60. Geburtstag.

Tabelle 1. *Ausscheidung von β-(4-Oxy-3,5-dijod-phenyl-)α-phenyl-propionsäure (J) und ihrer Konjugate in Harn und Galle nach p.o. und i.v. Gabe (100 mg/kg) bei Normal- und Choledochus-Fistel-Hund.* (Die Zahlen bedeuten Prozent der Gesamtausscheidung; Zahl der Versuche in Klammern)

Std nach Verabr. von 100 mg/kg	Harn										Galle	
	unveränderte I					Glucuronide					unveränderte I	
	ohne Hydrolyse		nach Hydrolyse								o. Hydr.	n. Hydr.
			a		b	II		III		IV		
	normal	Fistel	normal	Fistel	normal	normal	Fistel	normal	Fistel	normal		b
2 i.v.	47 (4)	42 (1)	91 (1)	—	90 (1)	34 (5)	52 (1)	31 (1)	—	43 (3)	43 (1)	91 (1)
p.o.	48 (1)	47 (1)	—	106 (1)	100 (1)	37 (2)	26 (1)	—	27 (1)	52 (1)	71 (2)	—
				93[1](1)								
4 i.v.	50 (4)	46 (5)	93 (1)	—	93[1](1)	41 (4)	42 (2)	23 (1)	—	41 (3)	67 (6)	—
p.o.	—	39 (2)	—	—	—	34 (2)	46 (1)	—	20 (1)	—	52 (1)	—
8 i.v.	44 (2)	—	—	—	—	17 (3)	—	41 (1)	—	43 (1)	51 (1)	—
p.o.	71 (1)	—	—	—	—	29 (2)	—	—	—	21 (1)	79 (1)	—
24 i.v.	72 (3)	—	—	—	—	30 (1)	—	—	—	—	—	—
p.o.	31 (1)	—	—	—	—	34 (2)	—	—	—	—	—	—
MW	53 (16)										64 (12)	

I: Ätherlöslicher Anteil, lösliches Ba-Salz = unveränderte I; Ia: I nach saurer Hydrolyse; Ib: I nach β-Glucuronidase-Inkubation; II: ätherunlöslicher Anteil, unlösliches Ba-Salz = 1. Konjugat; III: ätherunlöslicher Anteil, lösliches Ba-Salz = 2. Konjugat; IV: Butanolextrakt = II + III.

[1] Bezieht sich auf Hydrolyse von III.

demnach in Harn und Galle neben unveränderter I auch Glucuronide auf (siehe Tabelle).

In der Tabelle sind die nach Ätherextraktion bzw. Bariumfällung oder Butanolextraktion in Harn und Galle gewonnenen Fraktionen beim Normal- und Dauer-Choledochus-Fistel-Hund (s. vorangehende Arbeit)

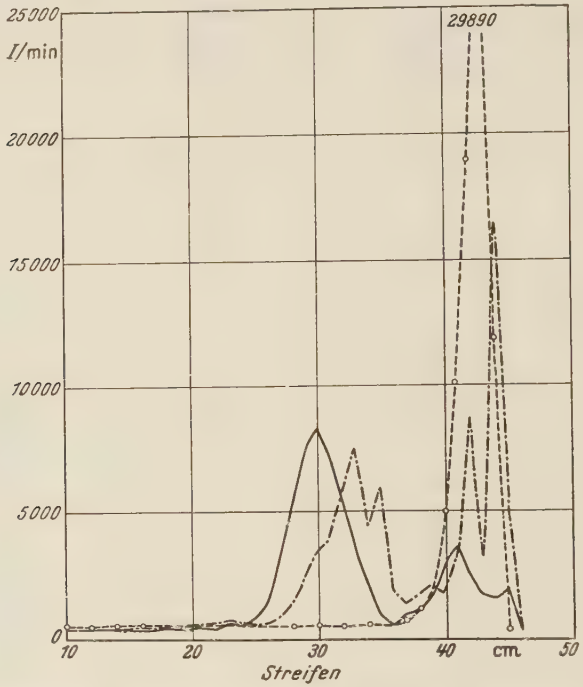


Abb. 1. Ausmessung des Chromatogramms von J^{131}-etikettierter β-(4-Hydroxy-3,5-dijodphenyl-) α-phenylpropionsäure (I) mit dem Szintillationszähler in reiner Lösung sowie im Harn nach Verabreichung derselben. —·—·— Harn nach Verabreichung von etikett. I + Zusatz von etikett. I; ——— Harn nach Verabreichung von etikett. I; - - - - - - - wäßrige Lösung von etikett. I

nach i.v. und p.o. Verabreichung von 100 mg/kg I im Verlauf von 2 bis 24 Std zusammengestellt.

Daraus erkennt man: I wird beim Hund im Harn zu 50% unverändert und der Rest als Glucuronid ausgeschieden. Die Glucuronide sind butanollöslich und geben zum großen Teil schwerlösliche Bariumsalze. Der konjugierte Anteil ist bei p.o. und i.v. Gabe, unabhängig von der Zeit nach der Verabreichung, etwa gleich groß. Zwischen Normal- und Choledochus-Fistel-Tier besteht kein Unterschied hinsichtlich Konjugation. In der Galle sind ungefähr $^2/_3$ unveränderte I vorhanden. Nach den Ergebnissen der vorangehenden Arbeit werden im Harn 26,7% der Eingabe ausgeschieden. Davon sind 13,35% unveränderte I und 13,35% I-Glucuronid. In der Galle werden 52,7% ausgeschieden, davon 35,2%.

unveränderte I und 17,6% als Glucuronid. Der in der Galle auftretende Glucuronid-Anteil von 17,6% kann für die Frage der Rückresorption keine große Bedeutung haben. Deshalb haben wir auf die schwierige Reindarstellung des I-Glucuronids verzichtet.

Die Glucuronide von I sind besser harn- als gallegängig.

Der Versuch, I und seine Metabolite durch chromatographische Aufteilung [Barrollier (1)] zu erfassen, mißlang. — Durch Messung der Aktivität des Chromatogramms von J^{131}-etikettierter I gelang es mit dem Szintillationszähler[1] zwei Gipfelpunkte nachzuweisen:

Ein 4 Std-Harn nach Verabreichen von 2 g I wurde eingeengt und in $^1/_{10}$ Volumen Soda aufgenommen. Ein aliquoter Teil wurde auf Papier aM Schl. u. Sch. 2045, 4 cm breit, aufgetragen und im System Pyridin: Propanol: Wasser = 35 : 35 : 40 laufengelassen. Zur Messung kamen die in 0,5 cm breite Stücke geschnittenen Streifen in Reagensgläschen von gleichem Durchmesser im Bohrloch-Kristall.

Es zeigten sich zwei dicht nebeneinanderliegende Zonen, von denen die eine I in reiner Lösung oder im Harnzusatzversuch entsprach. Es gelang auch durch Zusatz von I zu diesem Harn die entsprechende Zone zu vergrößern.

Es lassen sich demnach 2 verschiedene, ähnlich wandernde Verbindungen nachweisen (Abb.).

Mit Hochspannungselektrophorese (20—30 V/cm, Sichtbarmachung von I als schwerlösliches Rhodamin B-Salz, Papier Whatman 3 MM, 5 cm breit) nach einer von Dr. Barrollier ausgearbeiteten Modifikation [Barrollier (2)] zeigte sich, daß im hydrolysierten Harn die der I entsprechende Zone zunahm.

Summary

β-(4-Hydro-oxy-3,5-dijod-phenyl-)α-phenyl-propionic-acid (I) was shown unchanged and as I-glucuronides after administration to normal and choledochus-fistulated dogs (100 mg./kg. as Na-salt) in urine and bile. The I-glucuronides occur in respect to totalexcretion to about 50 p.c. in urine and 33 p.c. in bile. The glucuronides, which are chiefly excreted in urine, are not under consideration for the entero-hepatic circulation of I.

The preceding work points out the conclusions, which result from the metabolism of I for the judgement of resorption and excretion.

Literatur

Barrollier, J.: (1) Naturwiss. **42**, 486 (1955). — (2) zu veröffentlichen. — Clerc, E.: Ärztl. Wschr. **1955**, 1156. — Griessmann, H., u. W. Falck: Klin. Wschr. **1948**, 52. — Hinsberg, K., u. F. Bruns: in Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiol.- und pathol.-chem. Analyse. Springer 1953. — Roche, J., O. Michel, R. Michel and J. Tata: Biochim. et Biophysica Acta **13**, 471 (1954). — Schmidt, E. G.: J. Biol. Chem. **145**, 533 (1942).

[1] Die Messungen wurden von Herrn Dr. Kimbel ausgeführt.

Prof. Dr. Hedwig Langecker, Hauptlaboratorium der Schering AG., Berlin N 65, Müllerstr. 170—172

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 378—385 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke)

Reserpinwirkung auf das Kaninchen-ECG

Von
S. Sailer und Ch. Stumpf

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Januar 1957)

Obwohl Reserpin zur Gruppe jener Rauwolfia-Alkaloide gehört, die vorwiegend zentrale Wirkungen entfalten (Bein), ist seine Wirkung auf das Elektrencephalogramm (EEG) keineswegs geklärt. Vielmehr existieren bezüglich dieser Wirkung in der Literatur widersprechende Angaben: Einerseits wurde berichtet, daß Reserpin weder am Menschen (Monroe u. a.; Hafkenschiel u. a.; Colombati u. Benassi), noch an normalen oder epileptischen Affen (Schneider u. Earl; Chusid u. a.) sicher nachweisbare Veränderungen der elektrischen Spontanaktivität des Gehirns bewirkt; andererseits beschreiben Hess, sowie Flügel u. Bente eine eindeutige Zunahme langsamer Potentiale im EEG des Menschen unter Reserpintherapie und schließlich berichten Rinaldi u. Himwich (1955a u. b), daß das Kaninchen-EEG nach Reserpinverabreichung alle Charakteristica einer „arousal reaction" zeigt. Die letztgenannte Beobachtung wird im wesentlichen auch von Gangloff u. Monnier bestätigt. Ähnlich widersprechende Angaben finden sich bezüglich der Beeinflußbarkeit verschiedener Reizeffekte durch Reserpin: King Killam u. Killam finden, daß Reserpin an der Katze selbst in einer Dosierung von 100 mg/kg keinen Einfluß auf die durch elektrische Reizung ausgelöste „arousal" und „recruiting response" ausübt und übereinstimmend damit bewirkt Reserpin nach Barraclough auch an Ratten keine Veränderung der Reizschwelle im Mittelhirn für die Auslösung einer „arousal reaction". Demgegenüber berichten Gangloff u. Monnier, daß Reserpin an Kaninchen die Reizschwelle im Cortex und Diencephalon deutlich erhöht und außerdem die durch niederfrequente Reizung der ponto-bulbären Substantia reticularis im Thalamus und im Cortex ausgelösten Spitzenentladungen dämpft.

Auf Grund der oben angeführten Befunde erschien es uns daher interessant, die Reserpinwirkung auf das Kaninchen-EEG neuerlich zu untersuchen. Über die hierbei erhaltenen Ergebnisse wird in der vorliegenden Arbeit berichtet.

Methodik

Die Versuche wurden an 24 wachen, nicht curarisierten Kaninchen im Gewicht von 1,8—2,3 kg durchgeführt. Die Freilegung des Schädeldaches zur Fixierung der Elektroden erfolgte nach vorheriger reichlicher Infiltration der Kopfhaut mit 2%iger Novocainlösung ohne Adrenalinzusatz. Das Elektrocorticogramm (ECG) wurde nach der von Monnier u. Laue angegebenen stereotaktischen Methode abgeleitet und mit Hilfe eines direktschreibenden 8 Kanal-Elektroencephalographen, Marke Schwarzer, Type E 502, registriert. Die Elektroden waren extradural über der Area praecentralis granularis, parietalis und striata (Nomenklatur nach Rose) lokalisiert; die Ableitung erfolgte bipolar. Über nähere Einzelheiten der Methode siehe Monnier u. Laue, sowie Brücke u. a.

In 5 Versuchen wurde das Mittelhirn in der Höhe der Mitte der vorderen Vierhügel durchtrennt. Zu diesem Zweck wurden Trepanlöcher (Durchmesser: 7 mm) median unmittelbar vor der Sutura lambdoidea unter Schonung der Dura angelegt und diese erst unmittelbar vor der Durchtrennung aufgeschnitten. Die Kontrolle der Lage und des Ausmaßes der Durchtrennung erfolgte am formol-fixierten Gehirn durch makroskopische Inspektion.

Reserpin wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Tripod u. Meier durch Ascorbinsäurezusatz gelöst; in der verwendeten Lösung betrug die Reserpin-Konzentration 0,1% und die Ascorbinsäure-Konzentration 1%. In allen Versuchen wurde eine einheitliche Dosis von 2 mg/kg i.v. verabreicht. Außerdem wurden die Wechselwirkungen zwischen Reserpin einerseits und 1-Phenyl-2-methylaminopropan („Pervitin", „Methylamphetamin"), Mescalin* und Lysergsäurediäthylamid* (LSD) andererseits untersucht. Auch diese Substanzen wurden i. v. injiziert.

Ergebnisse

1. ECG-Veränderungen innerhalb kurzer Zeit nach der Reserpininjektion

Unmittelbar nach der Reserpininjektion (2 mg/kg) waren in keinem Versuch irgendwelche ECG-Veränderungen zu erkennen. Nach einer verschieden langen Latenzzeit, die 30—75 min betrug, zeigten sich im ECG Perioden, während derer alle Charakteristica einer „arousal reaction" nachweisbar waren (praecentral niedrige, hochfrequente Tätigkeit bei gleichzeitigem Fehlen der Spindeln und langsamen Frequenzen, parietal 4—6 Hz Rhythmus); zwischen diesen Perioden war das ECG völlig normal. Ebenso wie die Latenzzeit variierte auch die Häufigkeit und die Dauer dieser Perioden — meist einige Sekunden — von Versuch zu Versuch. In keinem Versuch und zu keinem Zeitpunkt nach der Reserpininjektion war das ECG ununterbrochen aktiviert.

In Abb. 1 sind zwei ECG-Ausschnitte eines Versuches einander gegenüber gestellt, und zwar zeigt der linke Teil (*A*) der Abbildung das normale Ruhe-ECG, der rechte Teil (*B*) eine der vielen in diesem Versuch auftretenden Aktivierungsperioden 80 min nach 2 mg/kg Reserpin. Die in Abb. 1 *B* gezeigte Aktivierungsperiode hat eine Dauer von etwa 6 sec.

* Wir danken Herrn Prof. Dr. F. Kuffner (II. Chemisches Institut der Universität Wien) für die Überlassung der verwendeten Mescalinmengen. Der Sandoz A.G., Basel, danken wir für die Bereitstellung von Lysergsäurediäthylamid.

Selbstverständlich können derartige Perioden auch am nichtvorbehandelten Tier auftreten. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen (ruhiger Raum, weitgehendes Fernhalten von irgendwelchen äußeren Reizen) waren sie jedoch äußerst selten und meistens — wie auch in dem in Abb. 1 wiedergegebenen Versuch — überhaupt nicht nachweisbar.

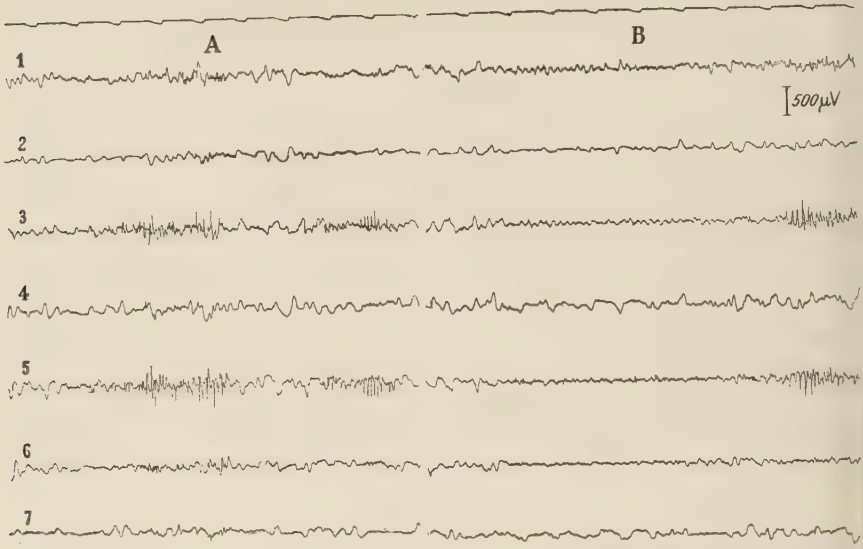


Abb. 1. Kaninchen-ECG. Ableitungen (von oben nach unten): (*1*) Links präcentral — parietal, (*2*) links parietal — Striata, (*3*) rechts präcentral — parietal, (*4*) rechts parietal — Striata, (*5*) präcentral links — rechts, (*6*) parietal links - - rechts, (*7*) Striata links — rechts. Zeitschreibung: 1 sec. *A*: Normales Ruhe-ECG. *B*: 90 min nach 2 mg kg Reserpin i.v.

Die beschriebenen Erscheinungen blieben etwa 1—2 Std lang unverändert bestehen; später schien die Dauer und insbesondere auch die Häufigkeit der Aktivierungsperioden wieder abzunehmen.

Wenn im ECG häufige Aktivierungsperioden auftraten, war gelegentlich auch eine Überempfindlichkeit der Tiere gegenüber verschiedenen äußeren Reizen zu beobachten. So zeigte sich z. B. oft, daß schwache akustische Reize (Händeklatschen), die vor der Reserpininjektion völlig wirkungslos waren, zu dieser Zeit eine kurzdauernde „arousal reaction" auslösten.

Da das Auftreten von Aktivierungsperioden unter der Reserpinwirkung eine periodenweise Erregung des ascendierenden retikulären Systems vermuten läßt, wurde an 5 Kaninchen das Mittelhirn in der Höhe der vorderen Vierhügel teils vor der Reserpininjektion, teils nach Eintritt der Reserpinwirkung durchtrennt. Diese Versuche zeigten, daß die Mittelhirndurchtrennung in der angegebenen Höhe das Zustandekommen von Aktivierungsperioden unter Reserpin vollständig verhindert.

Wurde die Durchtrennung nach dem Eintritt der Reserpinwirkung durchgeführt, so zeigte das ECG zunächst, in gleicher Weise wie bei nichtvorbehandelten Kontrolltieren, einen völlig flachen Kurvenverlauf; etwa ½ Std später war jedoch das ECG, ebenso wie bei nichtvorbehandelten Kontrolltieren, durch eine langsame, hohe Aktivität mit reichlicher frontaler Spindeltätigkeit gekennzeichnet.

2. ECG-Veränderungen 4—7 Std nach der Reserpininjektion

Da wir in den oben mitgeteilten Versuchen den Eindruck gewonnen hatten, daß das ECG einige Stunden nach der Reserpininjektion eher Normalisierungserscheinungen zeigt, andererseits aber die am Verhalten der Tiere erkennbare Reserpinwirkung eher noch im Zunehmen begriffen, zumindest aber maximal ausgeprägt ist, haben wir in einer weiteren Versuchsserie Reserpin 4—7 Std vor Versuchsbeginn injiziert. Die Tiere lagen nach dieser Zeit völlig teilnahmslos mit geschlossenen Augen in Seitenlage in ihren Käfigen, konnten jedoch durch äußere Reize ohne weiteres „erweckt" werden. Von allen in dieser Versuchsserie verwendeten Tieren war 1—2 Wochen vorher ein normales Ruhe-ECG abgeleitet worden, um eventuelle reserpinbedingte Veränderungen eindeutig erkennen zu können.

In den meisten Versuchen zeigte das ECG 4—7 Std nach der Reserpininjektion keinerlei Unterschiede gegenüber dem normalen Kontroll-ECG. Insbesondere waren zu diesem Zeitpunkt niemals spontane Aktivierungsperioden wie zu einem früheren Zeitpunkt zu beobachten. Hingegen fiel in einigen Versuchen eine Abnahme oder sogar ein weitgehendes Fehlen der frontalen Spindeltätigkeit auf, ohne daß jedoch gleichzeitig hohe Frequenzen nachgewiesen werden konnten. Es muß jedoch hervorgehoben werden, daß die Verminderung der Spindeltätigkeit unter Reserpin absolut kein konstantes Symptom darstellt.

Durch verschiedene äußere Reize konnte eine „arousal reaction" in gleicher Weise wie im Kontrollversuch ausgelöst werden. Eine Überempfindlichkeit der Tiere gegenüber äußeren Reizen wie zu einem früheren Zeitpunkt konnten wir niemals beobachten.

3. Wechselwirkungen zwischen Reserpin einerseits und Pervitin, Mescalin und LSD andererseits

Diese Versuche wurden in der Weise durchgeführt, daß zunächst Pervitin, Mescalin oder LSD allein in einer wirksamen Dosierung i.v. verabreicht und einige Tage später die gleichen Dosen dieser Substanzen am gleichen Tier, jedoch 4—7 Std nach 2 mg/kg Reserpin, ebenfalls wieder i.v. gegeben wurden. Auf diese Weise konnten miteinander vergleichbare ECG-Kurven erhalten werden.

a) Reserpin — Pervitin. Pervitin bewirkte in einer Dosierung von 20—30 mg/kg eine anhaltende „arousal reaction"; die frontale Spindeltätigkeit war hierbei jedoch nicht immer vollständig unterdrückt. Auf nähere Einzelheiten soll hier nicht näher eingegangen werden, da das völlig gleichartige Amphetamin-EEG von anderen Autoren bereits ausführlich beschrieben worden ist (Bradley; Bradley u. Elkes; Elkes u. a.; Hiebel u. a.; Rinaldi u. Himwich, 1955 b).

Nach Vorbehandlung mit Reserpin verursachte die gleiche Pervitin-Dosis im wesentlichen die gleichen ECG-Veränderungen wie am nicht-vorbehandelten Tier.

b) Reserpin — Mescalin. Übereinstimmend mit den Befunden von Rinaldi u. Himwich (1955 c) bewirkte Mescalin auch in unseren Versuchen eine anhaltende

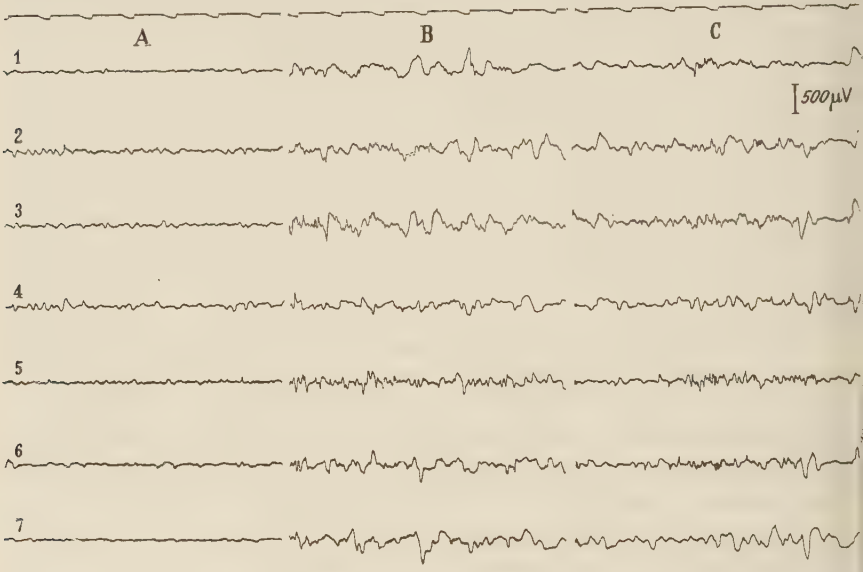


Abb. 2. Kaninchen-ECG. Ableitungen und Zeitschreibung wie in Abb. 1. *A*: ECG nach 30 γ/kg LSD i.v. *B*: Effekt einer gleich großen LSD Dosis nach Reserpinvorbehandlung (2 mg/kg Reserpin i.v. 5 Std vor LSD). *C*: ECG nach Verabreichung von weiteren 30 γ/kg LSD i.v.

„arousal reaction", und zwar zeigte das ECG nach 30—45 mg/kg Mescalin annähernd die gleichen Veränderungen wie nach 20—30 mg/kg Pervitin.

Nach Vorbehandlung mit Reserpin waren 30—45 mg/kg Mescalin praktisch wirkungslos; das ECG zeigte keinerlei Veränderungen, und in den präzentralen Ableitungen waren keine Desynchronisierungserscheinungen zu erkennen. Selbst die zusätzliche Verabreichung einer gleichen Mescalin-Dosis (insgesamt: 60—90 mg/kg) bewirkte keine sicher nachweisbaren ECG-Veränderungen; nur vereinzelt waren kurzdauernde Aktivierungsperioden zu erkennen. Gelegentlich konnten wir die Beobachtung machen, daß Mescalin dann zum Auftreten von frontalen Spindeln führte, wenn diese unter der Reserpinwirkung verschwunden oder zumindest stark reduziert waren.

c) Reserpin — LSD. 30 γ/kg LSD verursachten eine generelle Verflachung der ECG-Kurven. Auch die LSD-Wirkung wurde von Bradley, sowie von Bradley u. Elkes, Elkes u. a. und Rinaldi u. Himwich (1955 c) so eingehend beschrieben, daß hier auf die Wiedergabe von Einzelheiten verzichtet werden kann.

Nach Vorbehandlung mit Reserpin waren 30 γ/kg LSD praktisch wirkungslos. Zusätzliche Verabreichung von 20—30 γ/kg LSD führten in einigen Versuchen zu einer Verflachung der Kurven, immer waren jedoch 50—60 γ/kg LSD nach Reserpin schwächer wirksam als 30 γ/kg LSD am nichtvorbehandelten Tier.

In Abb. 2 ist ein Versuch, in dem die Wechselwirkung zwischen Reserpin und LSD untersucht wurde, wiedergegeben. Die Gegenüberstellung dieser Abbildung zeigt den Effekt von 30 γ/kg LSD vor (*A*) und nach Reserpin (*B*), sowie den Effekt von zusätzlich gegebenen 30 γ/kg LSD nach Reserpin (*C*). Die Verflachung der Kurven nach 60 γ/kg LSD war auch in diesem Versuch nicht annähernd so stark ausgeprägt wie nach 30 γ/kg LSD am nichtvorbehandelten Tier.

Diskussion

Unsere Versuche haben gezeigt, daß Reserpin (2 mg/kg i.v.) unmittelbar nach der Injektion das ECG völlig unbeeinflußt läßt, während nach einer Latenzzeit von 30—75 min deutliche Anzeichen einer Aktivierung im Sinne einer „arousal reaction" auftreten. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit den von Rinaldi u. Himwich (1955a u. b), sowie von Gangloff u. Monnier an der gleichen Tierart erhobenen Versuchsergebnissen. Die von Rinaldi u. Himwich (1955a u. b) vertretene Ansicht, daß Reserpin zu dieser Zeit eine Erregung des ascendierenden retikulären Systems bewirke und die angeführten ECG-Veränderungen auf diese Wirkung zurückzuführen seien, konnten wir dadurch bestätigen, daß nach Mittelhirndurchtrennung in der Höhe der vorderen Vierhügel Reserpin nicht mehr imstande ist, Aktivierungserscheinungen im ECG hervorzurufen. Diese Wirkung erklärt auch die ebenfalls bereits von Rinaldi u. Himwich (1955a u. b) beschriebene Überempfindlichkeit der mit Reserpin vorbehandelten Tiere gegenüber schwachen äußeren Reizen, die nach Reserpinvorbehandlung viel häufiger zu einer „arousal reaction" führen als am normalen Tier.

Wir glauben jedoch, daß alle diese ECG-Veränderungen nur als initiale Symptome der Reserpinwirkung zu bezeichnen sind, da das ECG in unseren Versuchen 4—7 Std nach der Reserpininjektion niemals irgendwelche Anzeichen einer Aktivierung durch das ascendierende retikuläre System zeigte. Zu diesem späten Zeitpunkt nach der Reserpininjektion läßt sich das ECG nicht mit Sicherheit von einem normalen ECG unterscheiden, auch dann nicht, wenn ein normales Kontroll-ECG des gleichen Tieres zum Vergleich vorliegt. Die reduzierte Spindeltätigkeit

ist — wie bereits erwähnt — kein konstantes Symptom. Zur gleichen Zeit hat jedoch die am Verhalten der Tiere erkennbare Reserpinwirkung ihr Maximum erreicht.

Bemerkenswert erscheint uns nun die Tatsache, daß zu diesem Zeitpunkt, auch bei scheinbar völlig normaler bioelektrischer Tätigkeit des Cortex, Pervitin, Mescalin und LSD unterschiedliche Wirkungen auf das ECG entfalten. Gemeinsam ist diesen drei Substanzen, daß sie am nichtvorbehandelten Tier das ECG im Sinne einer Amplitudenabnahme und Frequenzzunahme in den frontalen Ableitungen verändern. Wie insbesondere Bradley u. Elkes, Elkes u. a. und Bradley zeigen konnten, kommt jedoch sicherlich die Wirkung von Amphetamin (das dem Pervitin chemisch sehr nahe steht) auf prinzipiell andere Weise zustande als die LSD-Wirkung: Die Amphetaminwirkung wird — wie auch Hiebel u. a. zeigen konnten — durch Mittelhirndurchtrennung (cerveau isolé) aufgehoben, während tiefere Durchtrennungen die Amphetaminwirkung unbeeinflußt lassen; andererseits ist LSD nicht nur am cerveau isolé, sondern auch am encéphale isolé unwirksam. Die genannten Autoren folgern daraus, daß Amphetamin, nicht aber LSD, seine Wirkung auf das EEG durch eine Erregung des ascendierenden retikulären Systems ausübt und diese Wirkung daher mit Recht als „arousal reaction" bezeichnet werden kann. Andererseits weist auch Purpura darauf hin, daß die durch LSD ausgelösten EEG-Veränderungen nicht als „arousal reaction" bezeichnet werden dürfen, da sie nicht durch eine primäre Erregung des ascendierenden retikulären Systems zustande kommen. Über Mescalin sind unseres Wissens keine derartigen Untersuchungen durchgeführt worden, doch sprechen Untersuchungen von Rinaldi u. Himwich (1955c) dafür, daß Mescalin und LSD zumindest ähnlich wirken; nach diesen Autoren vermag nämlich α-4-Piperidyl-benzhydrol („Frenquel") die durch Mescalin und LSD ausgelösten EEG-Veränderungen zu normalisieren, nicht aber jene EEG-Veränderungen, die durch Amphetamin, Diisopropylfluorophosphat und α-2-Piperidyl-benzhydrol („Meratran") verursacht sind.

Nach unseren Untersuchungen verhindert nun eine Reserpin-Vorbehandlung die Mescalin- und LSD-Wirkung, nicht aber die Pervitinwirkung. Es darf daraus wohl der Schluß gezogen werden, daß Reserpin eine Erregung des ascendierenden retikulären Systems nicht zu dämpfen vermag, wie ja auch zu jeder Zeit nach der Reserpinzufuhr eine „arousal reaction" durch äußere Reize ausgelöst werden kann. Es ist daher auch anzunehmen, daß sich der Antagonismus zwischen Reserpin einerseits und Mescalin und LSD andererseits an anderen Angriffspunkten im ZNS abspielt. Möglicherweise spielt zumindest bei dem Antagonismus zwischen Reserpin und LSD die von Brodie u. a. und Pletscher u. a. nachgewiesene Serotonin freisetzende Wirkung von Reserpin eine Rolle.

Zusammenfassung

Nach Verabreichung von 2 mg/kg Reserpin i.v. zeigt das Kaninchen-ECG nach einer Latenzzeit von 30—75 min deutliche Anzeichen einer Aktivierung durch das ascendierende retikuläre System. Diese Aktivierungserscheinungen können durch Mittelhirndurchtrennungen in der Höhe der vorderen Vierhügel aufgehoben werden. 4—7 Std nach der Reserpinzufuhr zeigt das ECG keine sicher nachweisbaren Veränderungen, nur gelegentlich ist die Spindeltätigkeit reduziert. Zu diesem Zeitpunkt entfaltet Pervitin seine normale Wirkung auf das ECG, nicht aber Mescalin und LSD. Die Wirkung dieser beiden Substanzen wird durch Reserpinvorbehandlung aufgehoben.

Literatur

Barraclough, Ch. A.: Federat. Proc. **14**, 9 (1955). — Bein, H. J.: Pharmacol. Rev. **8**, 435 (1956). — Bradley, P. B.: III. Internat. EEG Congress 1953, p. 21. — Bradley, P. B., and J. Elkes: J. of Physiol. **120**, 13 P (1953). — Brodie, B. B., A. Pletscher and P. A. Shore: Science (Lancaster, Pa). **122**, 968 (1955.) — Brücke, F., H. Petsche, S. Sailer u. Ch. Stumpf: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 408 (1956). — Chusid, J. G., L. M. Kopeloff and N. Kopeloff: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **88**, 276 (1955). — Colombati, S., u. P. Benassi: Gazz. med. ital., Torino **114**, 4 (1955); (zit. bei H. J. Bein). — Elkes, J., C. Elkes and P. B. Bradley: J. Ment. Sci. **100**, 125 (1954). — Flügel, F., u. D. Bente: Dtsch. med. Wschr. **1956**, 81, 2071. — Gangloff, H., u. M. Monnier: Experientia (Basel) **11**, 404 (1955). — Hafkenschiel, J. H., A. M. Sellers, G. A. King and M. W. Thorner: Ann. New York Acad. Sci. **61**, 78 (1955). — Hess, R.: II. Serpasil Symposium, Zürich, 4. 3. 1955. Schweiz. med. Wschr. **1955**, 85, 442. — Hiebel, G., M. Bonvallet, P. Huve et P. Dell: Sem. hôp. Paris **30**, 1880 (1954). — King Killam, E., u. K. F. Killam: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **116**, 35 (1956). — Monnier, M., u. H. Laue: Helvet. physiol. Acta **11**, 73 (1953). — Monroe, R. R., R. G. Heath, W. A. Mickle and W. Miller: Ann. New York Acad. Sci. **61**, 56 (1955). — Pletscher, A., P. A. Shore and B. B. Brodie: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **116**, 84 (1956). — Purpura, D. P.: Arch. Neurol. Psychiatr. **75**, 132 (1956). — Rinaldi, F., and H. E. Himwich: Ann. New York Acad. Sci. **61**, 27 (1955 a). — Dis. Nerv. Syst. **16**, 133 (1955 b). — Science (Lancaster, Pa.) **122**, 198 (1955 c). — Rose, M.: J. Psychol. **43**, 353 (1931). — Schneider, J. A., and A. E. Earl: Federat. Proc. **13**, 130 (1954). — Tripod, J., u. R. Meier: Arch. internat. pharmacodynamie **97**, 251 (1954).

Dr. S. Sailer, Pharmakologisches Institut der Universität, Wien IX./Österr., Währingerstr. 13a

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 386—405 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

Theophyllinwirkungen am Herzlungenpräparat der Katze*

Von
G. Härtfelder und G. Kuschinsky

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. Januar 1957)

Von den Pharmaka aus der Gruppe der Methylxanthine wird häufig Theophyllin (Th.) für die Behandlung bestimmter Herzkrankheiten verwendet. Dabei wird im allgemeinen neben einer koronarerweiternden Wirkung auch eine Förderung der Herzmuskelleistung angenommen. Der Nachweis einer direkten Beeinflussung des Myokards war indessen bis vor kurzem noch recht wenig gesichert. Zwar hatten einige Autoren [Starr, Gamble, Margolies, Donal, Joseph u. Eagle (1937); Boyer u. Green (1941); Howarth, McMichael u. Sharpey-Schafer (1947); Schmid, Bubnoff u. Taugner (1955)] in Versuchen am Menschen oder Ganztier eine Zunahme des Minuten- oder Schlagvolumens, bzw. der Herzkraft gefunden. Aus den Versuchen am ganzen Organismus läßt sich jedoch kein bindender Schluß auf den Angriffspunkt ziehen, da auch eine indirekte Herzwirkung über eine Stimulierung des Zentralnervensystems möglich ist. Im Gegensatz zu den genannten Untersuchern sah Berseus (1943) keine Änderung der Herzleistung am Menschen. Auch nach Howarth, McMichael u. a. fand sich die stimulierende Wirkung nur bei ganz bestimmten Herzkrankheiten („hypertensive Herzschwäche"). Am isolierten Papillarmuskel der Katze hat allerdings Krop (1944) einen direkten positiven Effekt nachweisen können, aber nur bei sehr hohen Dosen. Für therapeutisch erreichbare Konzentrationen fanden an demselben Präparat erst Kuschinsky u. Muscholl (1956) eine eindeutig positiv inotrope Wirkung.

Es blieb noch offen, wie sich ein solcher (nunmehr gesicherter) muskelstimulierender Effekt auf das Verhalten des normal arbeitenden ganzen Herzens auswirkt, das nicht unter dem Einfluß des Zentralnervensystems steht. Hierüber liegen nur wenige und zudem nicht übereinstimmende Ergebnisse vor. So beobachteten Flaum u. Rössler (1933) sowie Hardman, Yard u. Chenoweth (1953) eine Leistungssteigerung am Herzlungenpräparat (HLP) des Hundes, Kohn (1933) sah

* Die Arbeit wurde aus Mitteln der Landesversicherungsanstalt Rheinland-Pfalz unterstützt.

keine oder eine negative Wirkung am gleichen Präparat der Katze, und auch Lüllmann (1955) konnte an der Ratte keine einheitlichen Befunde erheben. Da Lüllmann zugleich zeigte, daß der Papillarmuskel der gleichen Tierart nicht positiv inotrop reagierte, lag der Gedanke einer Specieseigentümlichkeit nahe. Es blieb daher noch zu prüfen, wie sich Th. am HLP der Katze auswirkt, für deren Papillarmuskel ein positiv inotroper Effekt erwiesen war und für deren HLP andererseits keine Myokardstimulierung gezeigt werden konnte (Kohn, 1933). Damit mußte sich zugleich die Frage beantworten lassen, ob Befunde am Papillarmuskel auch für Theophyllin als repräsentativ gelten können. Außerdem sollten die quantitativen Beziehungen durch statistische Analysen stärker als bisher herausgearbeitet werden.

Methodik

Katzen mit einem Gewicht von etwa 2 kg wurden nach Narkotisierung mit 0,03 g/kg des Natriumsalzes der β-Bromallyl-sek. butyl-barbitursäure (BBB) (= Pernokton)[1] i.p. in Eiswasser bis auf ungefähr 17° C rectal unterkühlt. Rund 1¼ Std nach Beginn sistierte die Atmung fast völlig, und die Herzaktionen waren nicht mehr sichtbar oder palpabel.

Wir präparierten das HLP nach Starling (1923) mit einigen Modifikationen: Der aus Polyvinylchlorid (PVC) bestehende Aortenschlauch wurde direkt am Aortenbogen eingebunden; der innere Durchmesser betrug 4—5 mm. Der Windkessel im Anfangsteil des arteriellen Systems faßte 7 ml, der arterielle Druck wurde seitenständig mit einem Statham-Element gemessen. Als peripherer Widerstand wurde ein typischer Starling-Widerstand verwendet mit einem Gesamtvolumen von 500 ml, d. h. der Elastizitätskoeffizient des gesamten arteriellen Systems hatte den üblichen Wert. [Auf die von Knebel (1941a; 1941b) geforderte stärkere Einengung des Widerstandswindkessels wurde verzichtet, da es sich um eine rein pharmakologische Untersuchung handelte.] Hinter dem peripheren Widerstand, der auf 70 mm Hg eingestellt wurde, befand sich eine Laufstrecke für die Bubble-Flow-Meter (BFM) -Registrierung mit einem Fassungsvermögen von 6,75 ml; davor mußte ein weiterer Windkessel eingeschaltet werden, da bei zu stark pulsierenden Luftblasen Doppelschaltungen des BFM auftraten. Die BFM-Apparatur wurde in Anlehnung an Braun, Althoff u. Taugner (1954) hergestellt. — Von der Meßstrecke wurde das Blut in ein Reservoir mit großer Oberfläche geleitet, das im Thermostatenbad bei 40° C gehalten wurde. Der Blutspiegel befand sich im Normalfalle 10 cm über dem rechten Vorhof; nur zur Durchführung des Kompetenz-Testes (Wollenberger, 1947) wurde er um 2—5 cm vorübergehend erhöht. Der venöse Schlauch wurde in die V. cava inferior eingebunden; der innere Durchmesser war je nach Venengröße 2,5—4,0 mm. — Die zirkulierende Blutmenge betrug 200 ml.

Zur Registrierung des rechten Vorhofdruckes legten wir in die V. cava sup. einen Katheter, der mit einer Frankschen Kapsel verbunden war. Arterieller und venöser Druck, sowie Zeitmarkierung und BFM-Impulse (= Minutenvolumen) wurden auf einem Photokymographion registriert. — Zur Beatmung diente ein in unserer Werkstatt konstruierter einfacher Apparat, der die unter leichtem Überdruck (15 cm H_2O) stehende Sauerstoffleitung und den Ausatmungsschlauch in der gewünschten Frequenz (24/min) abwechselnd freigab und abschloß. Die Lungen

[1] Wir danken der Firma Riedel-de Haën A.G. für freundliche Überlassung größerer Versuchsmengen.

wurden so über eine Trachealkanüle wie mit der Starling-Pumpe künstlich gedehnt und konnten von selbst wieder kollabieren.

Die Eichung des BFM ergibt auf doppelt logarithmischem Papier eine Gerade, die nur um einen kleinen Winkelbetrag von der theoretisch zu erwartenden (log Minutenvolumen $= \log \frac{\text{Volumen der Laufstrecke}}{\text{Blasenlaufzeit (min)}}$) verschieden ist, im gleichen Sinne, wie von Bruner (1948) und Baumgartner, Grupp u. Janssen (1955) beschrieben.

Blutflüssigkeit und Substanzen: Es wurde Blut aus 1—2 Spenderkatzen genommen, denen 0,1 ml/kg Liquemin[1] i.v. und während des Entblutens 3 × 20 ml Tyrode i.v. injiziert wurde. Anschließend fügten wir dem Blut 0,1 g Dextrose/100 ml und nochmals 0,2 ml Liquemin zu. Das Versuchstier erhielt 0,2 ml Liquemin i.v. Zur Schädigung des Herzens wurde das schon zum Narkotisieren verwendete Barbiturat BBB in mehrmaligen, meist fortschreitend kleineren Dosen ins Reservoir unter Umrühren gegeben. Theophyllinum purum „Ingelheim[2]" in 0,9%iger Kochsalzlösung wurde innerhalb 10 sec 40 cm vom Herzen entfernt in den zuführenden („venösen") Schlauch injiziert. Die weitaus größte Zahl der Versuche wurde mit Katzenblut durchgeführt, nur wenige mit einer Rindererythrocyten-Peristonaufschwemmung. Methodische Einzelheiten hierzu sollen in einer späteren Arbeit berichtet werden.

Statistische Auswertung nach Snedecor (1950), Linder (1951) und Koller (1955).

Ergebnisse

In den vorliegenden Versuchsreihen wurde im einzelnen der Einfluß von Theophyllin (Th.) auf Herzfrequenz, Minutenvolumen, Schlagvolumen, Druck im rechten Vorhof bei konstanter Einflußhöhe, auf systolischen und diastolischen arteriellen Druck, sowie teilweise auf den Kompetenzindex gemessen.

Durch die Einbeziehung statistischer Methoden war es möglich, die Abhängigkeit der Wirkung von der Dosierung, den Einfluß einer vorangegangenen Barbituratschädigung[3], sowie die Veränderung des Effekts bei Wiederholung am gleichen Präparat quantitativ zu analysieren. Außerdem wurden noch folgende Befunde erhoben: Anteil der Frequenzänderung an der Steigerung des Minutenvolumens, Beeinflussung der Th.-Wirkung durch die Höhe des peripheren Widerstandes, Bedeutung der Sauerstoffsättigung des Blutes und Th.-Wirkung bei spontaner Insuffizienz.

Insgesamt wurden über 100 Versuche durchgeführt. Ein beträchtlicher Anteil von diesen diente ausschließlich dem Zweck, die günstigsten methodischen Bedingungen (Präparationstechnik, Starling-Widerstand, Windkessel, Bubble-Flow-Registrierung usw.) zu ermitteln und störende

[1] Von der Firma Deutsche Hoffmann-La Roche A G., Grenzach/Baden, wurden wir mit Versuchsmengen in dankenswerter Weise unterstützt.

[2] Für die uns zur Verfügung gestellten Versuchsmengen danken wir der Firma C. H. Boehringer Sohn, Ingelheim.

[3] Hierüber wird in einer weiteren Arbeit gesondert berichtet, um die Betrachtung als multiple Regression hervorzuheben.

Faktoren möglichst zu isolieren, um die an sich große Streuung zu vermindern.

a) Wirkung von Theophyllin (qualitativ). Da am frischen HLP keine weitere Steigerung des Minutenvolumens zu erwarten ist (Anitschkov u. Trendelenburg, 1928; Krayer, 1931), schädigten wir das Herz vor der Th.-Injektion mit einem Barbiturat (BBB, siehe Methodik). (Diese Art der Schädigung ist schneller zu erzielen und besser zu beherrschen als eine hämodynamische.) Injiziert man anschließend 20 μMol (= 4 mg) Th. in den „venösen" Schlauch, so nimmt innerhalb einer ½ min Frequenz und Minutenvolumen zu. Jene ist aber nur in geringerem Maße erhöht. Das bedeutet, daß auch das Schlagvolumen gesteigert ist. Da auch die Anpassungsfähigkeit des Starling-Widerstandes nicht mehr ausreicht, erhöht sich der Druck im arteriellen System. Die Herzarbeit ist also vermehrt, die als Produkt aus prozentualer Zunahme von Frequenz, Schlagvolumen und effektivem arteriellem Druck definiert ist. Gleichzeitig sinkt der Druck im rechten Vorhof ab. Nach etwa 1½ min erreicht die Wirkung im allgemeinen ihren Höhepunkt, sie ist nach 5 min auf ungefähr ⅔—½ zurückgegangen und unterscheidet sich nach 10 bis 20 min kaum mehr von der Ausgangslage (Abb. 1). Die zu Beginn des Versuches vor der Schädigung gemessenen Werte werden in der Regel nicht erreicht; ein Effekt, der bekanntlich mit Adrenalin und Strophanthin sicher zu erzielen ist. Ähnliches gilt für die Größenveränderung des unter der Schädigung dilatierten Herzens: So gut wie in keinem Falle kam es zu einer ebenso ausgeprägten Verkleinerung des Herzvolumens wie nach Adrenalin oder Strophanthin. Allerdings wurde die Herzgröße nicht objektiv gemessen.

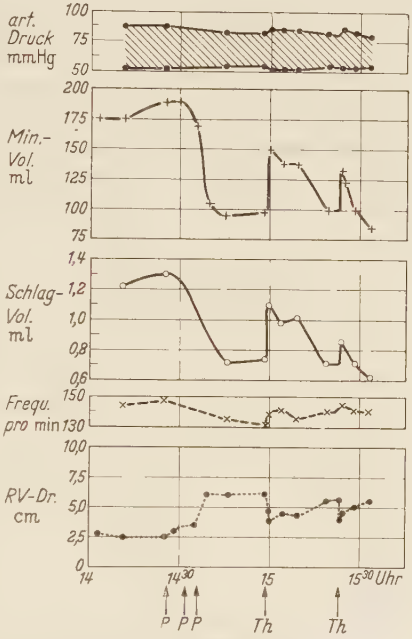


Abb. 1. Typische Theophyllinwirkung am Herzlungenpräparat der Katze. — Narkose mit β-Bromallyl-sek.-butyl-barbitursäure (BBB), Unterkühlung auf 15,3° C Rectaltemperatur. — 13.20 Uhr: Herz an künstlichen Kreislauf angeschlossen. Blutspiegel im Reservoir 10 cm über dem rechten Vorhof, Starlingwiderstand 70 mm Hg. *P* Zugabe von je 10 mg BBB ins Blutreservoir; *Th.* Injektion von je 4 mg Theophyllin. Purum in den „venösen" Schlauch; *art. Druck* systolischer und diastolischer Druck in mm Hg; *Min.-Vol.* Systemminutenvolumen in Milliliter; *Schlagvol.* Schlagvolumen in Milliliter; *Freq.* Frequenz/min; *RV Dr* Druck im rechten Vorhof in Zentimeter Wasser

Tabelle 1. *Wirkung verschiedener Dosen Theophyllinum purum am Herzlungenpräparat der Katze nach Schädigung durch β-Bromallyl-sek. butylbarbitursäure (BBB). (Verminderung des Minutenvolumens um durchschnittlich 68%)*

BBB = insgesamt zugegebenes BBB; a = Werte zu Anfang des Versuches; n. Sch. = Werte 20 min nach letzter BBB-Gabe; $1\frac{1}{2}'$, 10′ = Werte $1\frac{1}{2}$ und 10 min nach Theophyllininjektion

Nr.	BBB mg	Druck re. Vorhof in cm Wasser				arterieller Druck in mm Hg				Frequenz pro min				Schlagvolumen in ml				Minutenvolumen in ml			
		a.	n.Sch.	$1^1/_2'$	10′	a.	n.Sch.	$1^1/_2'$	10′	a.	n.Sch.	$1^1/_2'$	10′	a.	n.Sch.	$1^1/_2'$	10′	a.	n.Sch.	$1^1/_2'$	10′
I. 5 μMol = 1 mg Theophyllinum purum in den Zuflußschlauch																					
1	80	2,2	7,3	7,3	7,4	130/65	98/70	98/70	96/70	156	114	110	108	1,28	0,60	0,59	0,52	200	69	65	56
2	35	2,6	8,1	8,0	7,9	114/65	93/66	96/68	94/67	93	66	70	68	1,62	0,86	0,89	0,85	151	57	62	58
II. 10 μMol = 2 mg Theophyllinum purum																					
1	50	3,8	8,5	8,0	8,3						128	126	123		0,39	0,48	0,41	145	50	61	49
2	85	3,5	8,5	8,2	8,6	108/68	85/65	90/68	88/70	130	192[1]	196	200	1,30	0,24	0,29	0,20	169	46	56	41
3	55	3,8	7,6	7,6	7,6	119/61	87/69	88/69	84/69	146	136	142	138	0,94	0,31	0,32	0,27	137	42	45	37
III. 20 μMol = 4 mg Theophyllinum purum																					
1	66	3,2	9,2	8,4	9,0	93/57	81/64	88/53	83/60	138	86	86	86	1,05	0,36	0,86	0,40	145	31	74	34
2	60	2,5	8,5			102/48	82/45	90/45	90/45	160	116	120	122	1,25	0,58	0,78	0,75	200	67	94	91
3	75	1,9	9,0	8,4	9,0	80/45	65/45	73/48	70/48	228	123	126	128	0,61	0,28	0,37	0,33	139	35	47	42
4	99	2,9	8,5			110/40	68/40	75/38	73/38	156	104	106	110	0,96	0,54	0,82	0,77	150	56	87	85
5	50	2,0	6,1			102/55	85/48			202	142	143	140	0,96	0,69	0,83	0,65	195	98	118	91
6	45	3,0	7,3	6,5	7,0	92/50	65/46	78/43	70/45	168	139	144	144	1,05	0,43	0,67	0,51	176	58	96	73
7	90	2,6	8,4	7,4	7,6	112/33	75/43	82/43	80/46	150	97	114	110	1,34	0,56	0,66	0,70	200	54	92	77
8	35	2,0	4,6	2,6	2,3	125/65	95/60	95/60	96/59	147	118	118	128	1,31	0,63	0,66	0,57	192	75	78	73
9	35	2,6	7,0	6,7	6,7	117/62	77/51	82/55	80/52	200	124	128	124	0,69	0,30	0,34	0,33	137	37	44	41

IV. 40 μMol = 8 mg Theophyllinum purum

1	35	2,7	9,1	6,6	7,9	118/48	80/64	108/57	92/61	156	149	158	152	1,32	0,31	0,70	0,51	205	46	111	78
2	45	3,4	7,4	4,5	5,6	125/57	83/55	100/57	95/60	194	136	135	138	1,02	0,29	0,66	0,49	199	40	89	68
3	55	3,5	7,8	7,3	7,5	130/70	100 75	108/72	104/75	150	118	118	116	1,28	0,67	0,80	0,72	192	79	95	84
4	30	5,0	9,0	8,0	7,5	108/60	92 56	105/70	103/65	106	64	90	100	1,54	0,66	1,02	0,99	163	42	92	99
5	65	1,6	7,0	5,4	5,5	126/53	102/65	112/57	107/60	144	108	114	114	1,17	0,62	0,88	0,84	169	67	100	96

V. 60 μMol = 12 mg Theophyllinum purum

1	35	4,3	8,5	7,8	7,8	103/57	88 52	100/63	93/63	116	78	96	92	1,15	0,53	0,67	0,68	133	41	65	63
2	60	3,2	9,2	7,5	8,5	125/63	83 62	95/55	31/60	158	116	124	144	1,22	0,26	0,63	0,39	192	30	78	56

[1] P. alternans.

b) Dosisabhängigkeit der Theophyllinwirkung. Von den in den Tabellen angeführten Einzelbefunden (Schlagvolumen, Minutenvolumen, arterieller Druck, Herzleistung, Venendruck und Frequenz) wurden für die quantitative Analyse nur das Minutenvolumen und die Frequenz berücksichtigt, da das Minutenvolumen repräsentativ für die übrigen Meßgrößen ist. Außerdem konnten wir uns auf die Werte $1\frac{1}{2}$ min nach der Th.-Injektion beschränken; denn die Ergebnisse 5—10 min nach der Injektion sind ähnlich.

Da die Th.-Wirkung vom Ausmaß der bestehenden Insuffizienz beeinflußt wird (vgl. die spätere Arbeit), mußte in jedem Falle ein möglichst gleichmäßiger Schädigungsgrad erzielt werden. Dies gelang am sichersten bei schrittweiser Zugabe von fortschreitend kleineren Dosen des Barbiturats (BBB) in konstantem zeitlichem Abstand. Trotzdem blieb auch unter diesen Bedingungen eine gewisse Streuung; im Mittel betrug unsere Schädigung, am Minutenvolumen gemessen, 68,9 $\pm$ 1,7%, mit einem Streuungsbereich (range) von 50 bis 80%. Bei Zuführung einmaliger höherer Dosen BBB kommt es häufig nach einer vorübergehenden sehr starken Schädigung zu einem steilen Wiederanstieg des Minutenvolumens; man kann so die Wirkung weder genügend abstufen, noch eine gleichmäßige Ausgangslage erreichen.

Nach der letzten Barbituratgabe wurde unter Kontrolle des Minutenvolumens und Venendrucks 20 min gewartet und anschließend Th. in einer Dosis zwischen 5 μMol (= 1 mg) und 60 μMol (= 12 mg) injiziert. In Tab. 1

sind diese Versuche zusammengestellt. Für die statistische Auswertung kann man nur den ersten Th.-Effekt nach der Schädigung berücksichtigen, da sich bei der wiederholten Injektion quantitative Unterschiede der Th.-Reaktion ergeben. (Auf diese Beobachtungen wird im einzelnen in Abschnitt c) eingegangen.) Alle Werte der Tab. 1 beziehen sich deshalb auf den ersten Effekt.

Wir fanden, daß die Schwellendosis bei 5 μMol und das Optimum bei 40 μMol erreicht wird. Mit 60 μMol ist keine weitere Steigerung der Wirkung zu erreichen, eher eine Verschlechterung, die aber auf Grund der vorliegenden Daten noch nicht einwandfrei zu sichern ist. Versuche mit noch höheren Dosen wurden nicht durchgeführt, da der therapeutische Bereich überschritten würde.

Für die Aufstellung der Regressionsgleichung lassen sich verschiedene Größen als Meßwerte zugrunde legen. Wir haben die Dosis-Wirkungsbeziehung für die 3 einfachen theoretisch denkbaren Möglichkeiten berechnet:

1. Die Messung der Veränderungen des Minutenvolumens nach $1\frac{1}{2}$ min in ml $= Y_{\text{ml}}$: $Y_{\text{ml}} = -39{,}5 + 50{,}0 \log X$. $B = 0{,}532$ ($P < 0{,}001$). B ist das Bestimmtheitsmaß nach Linder. Wir bevorzugen es in diesem Zusammenhang gegenüber dem Korrelationskoeffizienten r, da die Definition von B anschaulicher ist. Durch B wird ausgedrückt, um welchen Bruchteil die Gesamtstreuung durch die Regressionsgleichung vermindert wird oder anders gesagt, wieviel von der Gesamtstreuung durch die Regression bestimmt ist. Mathematisch ist $B = r^2$; (siehe Abb. 2).

2. Die Messung der Veränderungen in Prozent gegenüber der Ausgangslage $= Y_{\%\text{AL}}$: $Y_{\%\text{AL}} = -81{,}0 + 103{,}2 \log X$. $B = 0{,}361$ ($P < 0{,}01$).

3. Die Bewertung des Effekts als prozentualer Ausgleich der Schädigung $= Y_{\%\text{Agl}}$: $Y_{\%\text{Agl}} = -26{,}03 + 36{,}1 \log X$. $B = 0{,}514$ ($P < 0{,}001$). (X bedeutet in jedem Falle die Theophyllindosis in μMol. Die Gleichungen sind aus je 19 Wertepaaren errechnet; auf die Ergebnisse aus den Versuchen mit der höchsten Dosis [60 μMol] wurde verzichtet, da hierdurch die lineare Beziehung etwas verschlechtert wird. Für die übrigen Werte ist Gradlinigkeit der Regression gesichert. Die Voraussetzung der Homogenität der Varianz wurde mit Bartletts Test geprüft).

Ein Vergleich zwischen den 3 Regressionen zeigt, daß die unter 2. genannte Funktion kein optimales Maß für unsere Versuche darstellt, obwohl danach sehr häufig in der Pharmakologie gerechnet wird. Der Wert für die Bestimmtheit ($B = 0{,}361$) ist hierbei am kleinsten und mit Hilfe einer Transformierung in gleiche Maßstäbe (nach Koller[1]) läßt sich nachweisen, daß dieser Unterschied zu den anderen Gleichungen überzufällig ist ($P \sim 0{,}03$). Das bedeutet aber, daß die Streuung um

[1] Herrn Prof. Koller sind wir für seinen Rat zu Dank verpflichtet.

die Regressionsgerade bei Berechnung der Wirkung in Prozent gegenüber der Ausgangslage am größten ist. (Besonders augenfällig wird dies, wenn man Effekte mit starker Schädigung und damit sehr niedrigen Ausgangsminutenvolumen betrachtet. Hier ergeben sich häufig extrem hohe Prozentwerte.) Zwischen den Regressionen 1. und 3. besteht hinsichtlich der Varianz nur ein geringfügiger Unterschied; möglicherweise ist die etwas geringere Bestimmtheit von 3. auf den nicht ganz konstanten

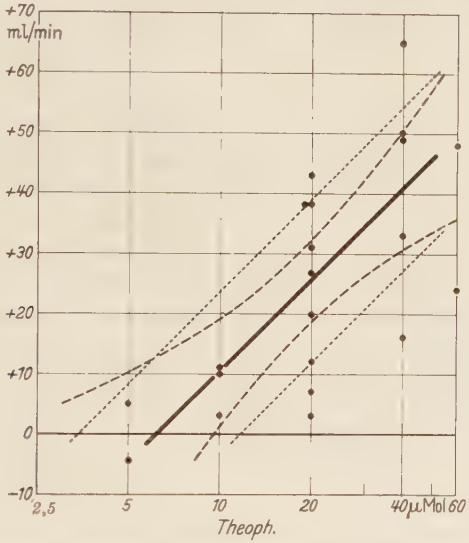


Abb. 2. Beziehung zwischen Theophyllin-Dosis und Wirkung am Herzlungenpräparat der Katze. — Minutenvolumenveränderung in Milliliter $1^1/_2$ min nach Theophyllininjektion. — 10 µMol = 4 mg Theophyllin. ——— Regressionsgerade $\hat{Y} = -39{,}46 + 50{,}0 \cdot \log X$; ($X$ Theophyllindosis in µMol); ..... Standardabweichung um die Regressionsgerade: $s_{Y \cdot X} = \pm 13{,}6$; - - - - 95% Vertrauensgrenzen der Regression:

$$\hat{Y} \pm s_{\hat{Y}} \cdot t_{0{,}05} = \hat{Y} \pm s_{Y \cdot X} \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(X_i - \bar{x})^2}{\Sigma (X_i - \bar{x})^2}} \cdot t_{0{,}05}$$

$$= \hat{Y} \pm 13{,}6 \cdot \sqrt{\frac{1}{19} + \frac{1}{15{,}89} \cdot \left[\left(\frac{\log X}{0{,}3010} - 0{,}3226\right) - 3{,}895\right]^2} \cdot 2{,}11$$

Schädigungsgrad zurückzuführen (vgl. die spätere Arbeit). Wir sehen in der Regression (1) die beste *einfache* mathematische Beschreibung des Th.-Effektes, da Störfaktoren (Schädigungsgrad usw.) sich hierbei am wenigsten auswirken.

Für alle Werte, einschließlich der 60 µMol Dosen, lautet die der Gleichung (1) entsprechende Regression:

$$Y_{\mathrm{ml}} = -32{,}58 + 43{,}94 \log X$$

$B = 0{,}496$ ($P < 0{,}001$). Die Bestimmtheit ist also geringer; deutlich verschieden ist das Ergebnis der Prüfung auf Linearität. Zwar ist die Abweichung von der Regression immer noch kleiner als die Versuchsstreuung, aber der Quotient

Versuchsfehler zu Abweichung beträgt jetzt 2,74 gegenüber 18,75 in der entsprechenden Regression ohne die 60 μMol-Werte.

Eine 4., etwas kompliziertere Möglichkeit, die positiv inotrope Wirkung auszudrücken, ist durch den sogenannten Kompetenzindex (C. I.) gegeben. Der C. I. wird seit Wollenberger (1947) häufig zur Bestimmung der „Reservekraft" des Herzens benutzt (Woods, Wyngaarden, Rennick u. Seevers (1949); Hardman, Yard u. Chenoweth; Price u. Helrich (1955a; 1955b) und bedeutet den Quotienten aus der Differenz des absichtlich vergrößerten Einflußdrucks (ΔEDr) und der dadurch zustande kommenden Venendruckerhöhung (ΔVDr) zu der Einflußdruckerhöhung (ΔEDr): $C.I. = \frac{\Delta EDr - \Delta VDr}{\Delta EDr}$. Da der C. I. sich nach Adrenalin oder Strophanthin leicht steigern läßt, ist er ein brauchbares zusätzliches Maß für die Bewertung eines positiv inotrop wirkenden Herzmittels. Die Durchführung des Testes war in unseren Versuchen

Tabelle 2. *Veränderungen des Kompetenzindex nach 40 μMol = 8 mg Theophyllin* a = anfangs; n. Sch. = nach Schädigung; n. 2′ = 2 min nach Injektion von Theophyllin, danach = etwa 5 min nach Theophyllingabe, — = C. I. nicht gemessen

	Vs. Nr.	Erhöhung der Einfl. Dr. (cm)	Kompet.-Index (= C.I.) a.	n. Sch.	n. 2′	danach	C.I. am gleichen Präp. nach Adrenalin
Versuch mit Katzenblut	1	+2 +1 +1	+0,88	—0,3	+0,8	+0,57	—
	2	+4	+0,88	—0,3	—	+0,28	—
	3	+3	+0,9	—	—	+0,87	—
	4	+3	+0,9	—0,33	—	+0,07	+0,83
	5	+2 +1 +1	—	0,0	0,0	—	+0,47
	6	+2 +1 +1	+0,95	0,0	—	0,0	—
	7	+2 +1 +1	+0,95	—0,20	—0,20	—	—
Versuch mit Peristonblut	1	+5	+0,9	+0,14	—0,2	—	+0,84
	2	+5,0	+0,42	0,0	—	+0,06	—
	3	+3	—	—	—	+(0,77[1])	—
						—1,53	—
	4	+2,5	+0,8	0,0	—0,16	—	+0,88

[1] Nach wenigen Sekunden Umschlag.

wegen der kurzen Dauer des Th.-Effektes erschwert. Wir versuchten es trotzdem und bestimmten den C. I.-Wert kurz nach Erreichen des Maximums, d. h. nach etwa 2 min. (Hierzu wurden auch einige Experimente mit einer Rindererythrocytensuspension in Periston als Blutersatz herangezogen.)

In unseren Versuchen war nach Th. nur in einem einzigen Falle eine Zunahme des C. I. zu errechnen, die auf eine Vermehrung der sogenannten Reservekraft hindeutet. In allen anderen Versuchen blieb der C. I. unverändert oder wurde sogar negativ. Das Herz hatte offenbar nicht

mehr genügend „Reservekraft", um mit der plötzlich erhöhten Leistungsanforderung fertig zu werden, und Vorhofdruck wie Minutenvolumen zeigten sogar ein schlechteres Ergebnis als bei dem gleichen Test in der Ausgangslage (Tab. 2).

Neben der geringen Wirksamkeit selbst optimaler Dosen in bezug auf Steigerung von Minuten- oder Schlagvolumen war auch das schnelle Abklingen des Effektes auffallend. Die Dauer war von der Dosis abhängig. Auf eine genaue Berechnung wurde aber verzichtet, da sich das Ende der Wirkung nur unscharf erfassen läßt. 20 min nach der Injektion war nur noch selten eine Wirkung nachzuweisen.

Im Gegensatz zum Minutenvolumen ergibt sich für die Frequenz nur eine schwach gesicherte Regression. Es läßt sich zwar eine Gleichung berechnen ($Y = -9{,}02 + 10{,}75 \log X$), in der eine Tendenz zur Vergrößerung der Y-Werte mit steigendem X zu erkennen ist; aber das Bestimmtheitsmaß beträgt nur 0,210. (Bei 19 Freiheitsgraden ist $B_{0,05} = 0{,}187$ und $B_{0,01} = 0{,}3011$. Mit der Varianzanalyse kann eine Dosisabhängigkeit der leichten Frequenzsteigerung nach Th. nicht gesichert werden (siehe folgenden Abschnitt).

c) Versuche über die quantitative Wiederholbarkeit des Theophyllineffektes. In Tab. 3a und 3b sind 12 Versuche zusammengestellt, bei denen die Th.-Injektion unter annähernd gleichen Bedingungen (Schädigungsgrad, Oxygenierung des Blutes, Zustand der Lunge) wiederholt werden konnte. Um zu einer umfassenden Aussage zu kommen, führten wir die statistische Prüfung in Form einer mehrfachen Varianzanalyse durch (Analyse von Zeitverlaufskurven nach Koller (1955), zugleich mit faktorieller Unterteilung; Homogenität der Varianz nach Bartlett geprüft).

Für das Minutenvolumen ergab sich neben der zu erwartenden Sicherung des Unterschieds zwischen den Dosen und zwischen den Zeiten (nach 1½ und 10 min) eine hochsignifikante Verminderung des Th.-Effektes bei der nachfolgenden Injektion ($P < 0{,}001$). Da die Wechselwirkung: Dosis-Injektionsreihenfolge nicht erhöht ist, darf angenommen werden, daß die „Tachyphylaxie" nach der 20 μMol — wie nach der 40 μMol-Dosis in gleichem Maße vorhanden ist.

Die Reduzierung der Th.-Wirkung bei Wiederholung erstreckt sich auch auf die Frequenzsteigerung ($P < 0{,}01$) (Tab. 3b). Eine besondere Wirkung der beiden Dosierungen ließ sich nicht nachweisen (vgl. auch die Behandlung als Regression). Außerdem fand sich überraschenderweise und im Gegensatz zum Minutenvolumen kein Unterschied zwischen den Werten nach 1½ min und 10 min, d. h. die Zunahme der Frequenz hielt länger an als die des Minutenvolumens.

d) Versuche bei konstanter Frequenz. Um die Frage zu prüfen, inwieweit die Steigerung des Minutenvolumens durch die gleichzeitig

Tabelle 3a. *Verminderung des Theophyllineffektes auf das Minutenvolumen bei Wiederholung der Injektion am gleichen HLP. Varianzanalyse.* (Die Zahlen in der Tafel bedeuten Veränderung in Milliliter gegenüber Ausgangslage)

Z_1, Z_{10} = Zeitpunkt $1^1/_2$ min nach Theophyllininjektion bzw. 10 min nach Theophyllininjektion; I_1, I_2 = Werte bei der 1. bzw. bei der 2. Theophyllininjektion; D_{20}, D_{40} = Werte bei einer Dosierung von 20 μMol bzw. 40 μMol Theophyllin; F_D, F_I, F_Z = Quotienten aus dem Durchschnittsquadrat der Streuung zwischen den Dosen bzw. der Injektionsreihenfolge bzw. den Zeiten zur Versuchsstreuung

		nach $1^1/_2$ min = Z_1		Nach etwa 10 min = Z_{10}	
		1. Inj. = I_1 ml	2. Inj. = I_2 ml	1. Inj. = I_1 ml	2. Inj. = I_2 ml
20 μMol = D_{20}	1	+38	+22	+23	+22
	2	+51	+24	+38	—13
	3	+27	+19	+ 4	— 2
	4	+50	+23	+30	—30
	5	+18	+16	+ 8	— 3
	6	+14	+ 6	+ 2	—26
40 μMol = D_{40}	7	+65	+60	+32	+77
	8	+16	+ 8	+ 5	— 8
	9	+50	+13	+57	+19
	10	+ 8	+14	0	+ 6
	11	+39	+22	+27	+ 4
	12	+13	+12	+13	+ 2

$F_D = 5{,}6$ ($P < 0{,}05$); $F_I = 19{,}8$ ($P < 0{,}001$); $F_Z = 19{,}8$ ($P < 0{,}001$); $s^2 = 104$; Wechselwirkung $(D \cdot I)$: $F_{D \cdot I} = 2{,}885$ ($P > 0{,}05$).

Tabelle 3b. *Verminderung des Theophyllineffektes auf die Herzfrequenz bei Wiederholung der Injektion am gleichen HLP. — Varianzanalyse.* (Die Zahlen in der Tafel bedeuten Änderung der Schlagzahl/min). Erklärungen der Abkürzungen siehe in der Legende zu Tab. 3a

	Versuch	nach $1^1/_2$ min = Z_1		nach etwa 10 min = Z_{10}	
		1. Injektion = I_1	2. Injektion = I_2	1. Injektion = I_1	2. Injektion = I_2
20 μMol = D_{20}	1	+17	+ 2	+13	+2
	2	+ 6	+ 4	+ 4	0
	3	+ 8	+ 8	0	+8
	4	— 6	— 6	+ 4	—6
	5	+20	+ 6	+16	—8
	6	+ 8	+ 2	+20	+4
40 μMol = D_{40}	7	+ 9	+13	+ 3	+23
	8	0	— 4	— 2	— 7
	9	+26	+ 2	+36	+ 4
	10	— 4	— 4	— 1	— 8
	11	+14	+ 8	+14	+10
	12	+ 4	+ 5	+ 4	+ 2

$F_I = 9{,}96$ ($P < 0{,}01$); $s^2 = 49$. Die übrigen F-Quotienten sind nicht signifikant.

vorhandene Frequenzzunahme bedingt ist, schalteten wir den Einfluß einer Frequenzänderung durch konstante elektrische Reizung aus. Es war zwar auf Grund der gleichzeitigen Schlagvolumenvermehrung wahrscheinlich, daß eine positiv inotrope Wirkung durch das Th. zustande kommt. Da die Leistung des Papillarmuskels allein durch Frequenzänderung beeinflußbar ist (Garb u. Penna, 1955; Trautwein u. Dudel, 1954; Lee, 1954; Furchgott u. Sleator, 1954; Cattel u. Gold, 1954) ließ sich jedoch einwenden, daß die Verstärkung des Schlagvolumens auch am HLP eine *Folge* der schnelleren Frequenz sein kann. In unseren Versuchen mit konstanter Schlagzahl ließ sich indes beweisen, daß unter Th. das Minutenvolumen auch ohne Veränderung der Frequenz zunimmt (Tab. 4). Die positive Chronotropie ist also nicht die einzige Ursache, wenn sie auch teilhat an der Gesamtzunahme des Minutenvolumens. Dies wird bestätigt durch eine größere Anzahl von Versuchen ohne elektrische Reizung, in denen eine Frequenzänderung ausblieb oder nur mäßig ausfiel. (Mehrere solche Ergebnisse sind in Tab. 1 enthalten).

e) Ergebnisse aus den übrigen Versuchen. Einige Versuche wurden am spontan insuffizienten Herzen gemacht. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß hier Th. etwas stärker und länger wirkt als am barbituratgeschädigten Herzen. Für einen quantitativen Vergleich reichen die Versuche aber nicht aus.

Aus der Zusammenstellung einer Anzahl von Versuchen mit verschiedenem peripheren Widerstand geht mit Wahrscheinlichkeit hervor, daß die Größe des peripheren Widerstandes innerhalb eines Bereiches von 40—90 mm Hg keine wesentliche Rolle für das Ausmaß des Th.-Effektes auf das Minutenvolumen spielt. Dies war nicht ohne weiteres zu erwarten. Zwar bleibt bei einem normal arbeitenden Herzen der periphere Widerstand innerhalb weiter Bereiche ohne Einfluß auf das Minutenvolumen (Knowlton u. Starling, 1912; Markwalder u. Starling, 1914); bei von vornherein niedrigem Widerstand ist jedoch zur gleichen Schädigung, am Minutenvolumen gemessen, eine größere Barbituratmenge notwendig. Dies vermindert unter anderen Voraussetzungen den Th.-Effekt (vgl. die spätere Arbeit). Hier wird aber die Reduzierung am Minutenvolumen nicht faßbar, da bei niedrigem Widerstand die gleiche Minutenvolumenzunahme unter Th.-Einwirkung mit einer geringeren Leistungszunahme möglich ist. Dadurch heben sich die entgegengesetzten Einflüsse der größeren Barbituratmenge und des verkleinerten Widerstandes praktisch auf.

Die Sauerstoffsättigung des Blutes wurde nicht objektiv gemessen. Es konnte aber gelegentlich beobachtet werden, daß selbst bei schlechter Oxygenierung (Blut dunkelrot bis blaurot) Th. unvermindert wirksam war.

Tabelle 4. *Versuche bei konstanter Herzfrequenz. Elektrische Reizung an Vorhof-Impulsstärke*

a = Werte zu Anfang; n. Sch. = Werte nach Schädigung durch Barbiturat; $1\frac{1}{2}'$, 5′ = Werte $1\frac{1}{2}$ bzw. 5 min nach Theophyllin-

Versuchs-Nr.	Druck im re. Vorhof (cm Wasser)					arterieller Druck (mm Hg)				
	a	n. Sch.	ei. R.	$1^1/_2'$	5′	a	n. Sch.	el. R.	$1^1/_2'$	5′
1	1,6	7,2	8,0	6,5	7,0	126/53	104/63	100/64	113/60	106/62
2	2,6	6,2	5,4	3,5	4,7	125/55	98/57	104/57	106/57	101/58
3	2,5	7,8	7,6	5,0	—	133/65	105/65	117/65	125/62	—
4	2,3	7,6	8,1	3,0	3,0	112/73	88/68	83/68	112/60	114/64
5	2,3	9,0	9,0	7,3	—	112/73	77/61	77/61	108/67	—
6	3,1	—	9,5	4,5	—	88/50	—	71/44	81/44	—

1. Versuch mit Katzenblut, 40 μMol Th.
2. Versuch mit Katzenblut, 40 μMol Th.
3. Versuch mit Katzenblut, 40 μMol Th.
4. Versuch mit Peristonblut, 40 μMol Th.
5. Versuch mit Peristonblut, 40 μMol Th.
6. Versuch mit Peristonblut, 20 μMol Th.

Besprechung

Vergleicht man die vorliegenden Ergebnisse mit den bereits bekannten Daten, so ergibt sich zunächst, daß übereinstimmend mit unseren Ergebnissen über das Verhalten der Frequenz am HLP kaum eine Meinungsverschiedenheit mit früheren Autoren besteht.

Ähnlich wie in den eigenen Versuchen fanden Flaum u. Rössler, sowie Hardman, Yard u. Chenoweth am Herzlungenpräparat des Hundes eine Zunahme, ebenso Lüllmann an der Ratte. Lediglich Kohn sah mit gleicher Methode an der Katze „bisweilen eine mäßige Beschleunigung", oft aber keine Veränderung oder eine leichte Arrhythmie. Am Ganztier bzw. am Menschen wurde nur von einem Teil der Autoren Frequenzsteigerung gefunden (Starr, Gamble, Margolies, Donal, Joseph u. Eagle; dagegen nicht regelmäßig von Schmid, Bubnoff u. Taugner; Howarth, McMichael u. Sharpey-Schafer). Sie wird wohl von der Empfindlichkeit des Vaguszentrums beeinflußt (Drill, 1954). Selbst an einem Objekt wie dem embryonalen Hühnerherzen wurde eine Frequenzsteigerung gesehen, bevor Nervenstrukturen nachweisbar sind (Brinley, 1932; Bürgi, 1937; allerdings nur mit Coffein geprüft).

Umstrittener erscheint die Beeinflussung des Minutenvolumens. Wie bereits erwähnt, beobachteten mehrere Autoren (Starr u. a.; Fowell u. a.; Fowell u. Winslow, 1949) eine Steigerung des Minuten- oder Schlagvolumens am Menschen. Das gleiche berichten Boyer u. Green (1941) und Schmid u. a. für den Hund. Wegen der nicht abtrennbaren Beteiligung des Zentralnervensystems lassen diese positiven Ergebnisse ebensowenig einen Schluß auf den Angriffspunkt zu wie die negativen von Berseus an Herzpatienten und von Huggins, Handley u. la Forge (1949) an „hypotonen" Hunden. Die einzigen Befunde, die wirklich einen direkten stimulierenden Effekt beweisen, finden sich in den bereits zitierten Arbeiten von Krop und Kuschinsky u. Muscholl für den Katzenpapillarmuskel sowie bei Flaum u. Rössler und Hardman u. a. für das HLP des Hundes. Hardman u. a. zeigten zugleich, daß die Äthylendiaminkomponente im Aminophyllin wesentlich zu der positiven Wirkung beiträgt. Ähnlich berichteten Howarth u. a. Da man nach diesen Befunden mit einer erheblichen Eigenwirkung des Th.-Lösungsvermittlers

Kammergrenze über Wollfadenelektroden (Rechteckimpulse, Impulsbreite 3,2 msec, supramaximal)
el. R. = Werte unter elektrischer Reizung kurz vor Theophyllininjektion; injektion unter fortgesetzter elektrischer Reizung

Frequenz/min					Schlagvolumen (ml)					Min-Volumen (ml)				
a	n.Sch.	el. R.	1½′	5′	a	n.Sch.	el. R.	1½′	5′	a	n.Sch.	el. R.	1½′	5′
144	112	140	140	140	1,17	0,73	0,54	0,68	0,61	169	82	75	95	86
150	110	140	140	140	1,23	0,84	0,69	0,71	0,69	184	92	96	99	92
160	134	158	158	—	1,06	0,58	0,52	0,79	—	169	78	83	125	—
190	125	156	141	154	0,76	0,39	0,27	0,96	0,75	145	49	42	136	115
190	130	160[1]	160	—	0,76	0,20	0,13[1]	0,42	—	145	26	20	67	—
113	83	125	125	—	1,06	0,47	0,04	0,82	—	120	39	5	103	—

[1] unregelmäßig.

rechnen muß, können die positiven Ergebnisse von Smith u. Jensen (1946), die mit Th.-aminoisobutanol am HLP des Hundes gewonnen wurden, nur begrenzt Gültiges für Th. aussagen.

Nach unseren Befunden ist es mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 99,9% ($P < 0{,}001$) sicher, daß Th. auch am Katzen-HLP eine positive Wirkung auf das Minutenvolumen hat. Das Schlagvolumen verhält sich gleichsinnig, bleibt allerdings infolge der meist vorhandenen Frequenzzunahme etwas hinter der prozentualen Zunahme des Minutenvolumens zurück. Die Beobachtungen von Kohn, daß am HLP der Katze „das Minutenvolumen teils gar nicht verändert wurde, teils ein wenig abnahm", müssen mit ungünstigen Wirkungsbedingungen erklärt werden (eine zu geringe oder zu starke Schädigung, eine ungeeignete Dosis oder ähnliches). Nachdem Kuschinsky u. Kalb (1957) inzwischen zeigen konnten, daß auch die Papillarmuskeln von jungen Hunden positiv inotrop auf Th. reagieren, ist für die Th.-Wirkungen mit einer weitgehenden Parallelität zwischen HLP und Papillarmuskeln, in bezug auf rein muskuläre Leistungen zu rechnen, zumal auch zwischen den negativen und nicht einheitlichen Wirkungen am Papillarmuskel und HLP der Ratte ein prinzipiell gleichartiges Verhalten erwiesen ist (Lüllmann; eigene Versuche).

Wenn auch unsere Ergebnisse qualitativ mit denen der beiden anderen Autoren, die am HLP des Hundes gearbeitet haben, übereinstimmen, so ist nicht zu übersehen, daß der leistungssteigernde Effekt an unseren Präparaten recht gering war. Anfangs erschien es, daß ein Alles-oder-nichts-Gesetz die Th.-Wirkung beherrscht. Wir prüften deshalb zur Festlegung der Wirkungsbedingungen die Dosisabhängigkeit. Dabei erwies sich infolge der nicht geringen Streuung eine statistische Analyse als unbedingt notwendig. Es zeigte sich dabei, daß diese auch auf Versuche am HLP gut anwendbar ist und man mit relativ wenig

Versuchen eine gesicherte funktionelle Beziehung ableiten kann. Dabei ergab sich für die Dosen 1—12 mg Th. (= 5—60 μMol Th.) eine lineare Regression im halblogarithmischen Koordinatensystem mit hochsignifikanten Koeffizienten. Damit ist eine einwandfreie Basis geschaffen für einen exakten Vergleich mit einem anderen Arzneimittel oder für die Beurteilung eines Th.-Antagonismus (vgl. die spätere Arbeit).

Die Schwellendosis (1,2 mg) und die Optimaldosis (8 mg) liegen durchaus innerhalb des therapeutischen Bereichs: 8 mg entsprechen etwa 4 mg/kg Katze, i.v. gegeben, gegenüber 2,8 mg/kg bei der therapeutischen, intravenösen Anwendung am Menschen. Die Berechtigung dieser Umrechnung ergibt sich aus der von uns angewandten Injektion in den zuführenden Schlauch, die der i.v.Applikation in der Therapie am nächsten kommt. Dagegen ist es nicht möglich, ins Reservoir gegebene Substanzmengen auf die Verhältnisse am Menschen zu übertragen. Eine zweite Möglichkeit des Vergleichs besteht in einer Berechnung der im Augenblick der Injektion gegebenen Konzentrationen: In unseren Versuchen entsprechen der Schwellendosis ungefähr $1:10^4$, der optimalen Dosis etwa $1:1{,}25 \cdot 10^3$. Diese Konzentrationen liegen wesentlich höher als die von Kuschinsky u. Muscholl am Papillarmuskel der Katze gefundenen (etwa $1:2 \cdot 10^5$ bzw. $1:10^4$) und die von Guggenheimer u. Sassa (1923) am isoliert durchströmten Katzenherz verwendeten ($1:10^5$ bzw. $1:2{,}5 \cdot 10^4$). Der Unterschied läßt sich leicht erklären durch die nur Sekunden dauernde Einwirkungszeit in unseren Versuchen im Gegensatz zu der beliebig langen Einwirkung bei den letztgenannten Methoden.

Die durchschnittliche maximale Verbesserung des Minutenvolumens betrug 40,1 ml bzw. einen 31,8%igen Ausgleich der gesetzten Barbiturat-Schädigung, (die etwa $^2/_3$ der Ausgangsleistung betrug). Demgegenüber haben Flaum u. Rössler (1933) und ähnlich Hardman u. a. (1953) am Hunde-HLP eine völlige Wiederherstellung des Anfangsminutenvolumens gesehen. Als wirksame Dosis haben Flaum u. Rössler 35 mg Theophyllin gefunden. Umgerechnet auf Kilogramm/Körpergewicht oder auf das Herzgewicht entspricht das etwa den von uns angewandten Dosen. Für die Versuche von Hardman u. a. ist kein Dosenvergleich möglich, da diese Autoren die Substanz ins Reservoir gaben. Es ist unwahrscheinlich, daß diese Applikationsform Ursache der stärkeren Th.-Wirkung ist. Wurde bei unseren Versuchen Th. mehrmals hintereinander injiziert, kurz nachdem das Optimum erreicht war, so ließ sich der erste Effekt nicht wesentlich vergrößern, nur etwas verlängern. Es bleibt infolgedessen die Annahme eines Speciesunterschiedes. Dafür sprachen auch die stark ausgeprägten positiven Befunde von Smith u. Jensen (1946) (mit Th.-aminoisobutanol) am HLP des Hundes und die schlechten Ergebnisse von Kohn (1933) am HLP der Katze.

Die Wirkung auf das Herz tritt nach Th. immer sehr schnell ein. In bezug auf die Wirkungsdauer liegen wiederum die Ergebnisse am HLP des Hundes günstiger als an der Katze (Flaum u. Rössler; Hardman u. a.). Nur Bodo (1927) und Kiese u. Gummel (1938) haben ein schnelles Abklingen — allerdings nach Coffein — betont.

Am Ganztier oder am Menschen wurden meist länger anhaltende Effekte gesehen, zum Teil bis über 60 min (Steinberg u. Jensen; Howarth u. a.; Starr u. a.; weniger bei Fowell u. Winslow). Eine synergistische zentralnervöse Beeinflussung ist nicht unwahrscheinlich, dauert doch z. B. die Stimulierung der Atmung nach ähnlichen Dosen am Ganztier (narkotisierter Hund) unter Umständen über Stunden an (eigene Versuche).

Überraschend war das Ergebnis unserer Versuche, den Effekt auf den Kompetenzindex zu bestimmen. Nach den Befunden mit anderen Herzstimulantien wie Strophanthin oder Adrenalin (Farah u. Maresch, 1948; eigene Versuche) hätte man erwarten sollen, daß der Kompetenzindex gesteigert wird. Hardman u. a. haben dies auch für Th. am HLP des Hundes gezeigt. Unsere negativen Ergebnisse dürften ihre Ursache darin haben, daß die angewandte plötzliche Erhöhung des Einflußdrucks eine zu große Anforderung an die durch Th. nur gering verbesserte Leistungsfähigkeit des Katzenherzens darstellt und die „Reservekraft" bereits von den wenigen Milliliter Minutenvolumen-Steigerung voll ausgeschöpft wird. Schon Farah u. Maresch hatten den Kompetenztest als ein gröberes (more vigorous) Kriterium der verbesserten Herzfunktion angesehen.

Die Th.-Wirkung war bei Wiederholung am gleichen Präparat signifikant vermindert, so daß für eine quantitative Auswertung nur jeweils der erste Effekt herangezogen werden konnte. (Das gleiche haben auch Kiese u. Gummel für Coffein gefunden). Dabei mögen in wechselndem Ausmaß Schädigungsgrad und Barbiturateinwirkung eine Rolle spielen, ferner auch eine langsam zunehmende Verschlechterung der Lungen und der Blutbeschaffenheit. Nach Price (1955) kommt es am HLP zu einer Säuerung des Blutes, und selbst eine geringfügige Verschiebung des p_H-Wertes hat eine Wirkung auf die Herzleistung. Schließlich kann der von der ersten Injektion vorhandene, wenn auch geringe Th.-Blutspiegel eine Bedeutung haben; im Herzen und in der Lunge wird Th. kaum gebunden (Schack u. Waxler, 1949).

Zur Frage, ob die Steigerung des Minuten- oder Schlagvolumens auf die gleichzeitig auftretende Vermehrung der Herzdurchblutung zurückgeführt werden kann, ist auf Grund eigener Beobachtungen keine Stellung zu nehmen. Flaum u. Rössler sowie Smith u. Jensen fanden am Hund keinen Beweis für einen solchen Einfluß der Coronardurchblutung auf den Th.-Effekt, ebenso sprachen sich Howarth u. a. aus. Boyer u. Green zeigten außerdem, daß die Steigerung der Kontraktionskraft der Durchblutungsvermehrung vorausgeht. Eine Durchblutungsvermehrung als

Folge gesteigerter Herzleistung ist nach Boyer (1943) durchaus möglich und wird für Th. diskutiert.

Insgesamt läßt sich aus unseren Versuchen ableiten, daß Th. zwar auch am HLP der Katze einen leistungssteigernden Effekt ebenso wie am Papillarmuskel des gleichen Tieres hat, diese Wirkung aber selbst bei optimalen Dosen nicht annähernd die gleiche Größe wie nach Adrenalin oder Strophanthin erreicht. Auch in der Dauer der Wirkung ist Th. zumindest dem Strophanthin weit unterlegen. Es wirkt gewissermaßen wie Adrenalin in Schwellendosis. Von einer Ähnlichkeit der Methylxanthine mit Adrenalin haben schon früher Anrep u. Stacey, Boyer u. Green sowie Kiese u. Gummel gesprochen. Nachdem am HLP und Papillarmuskel der Ratte die Th.-Effekte noch schwächer, zum Teil sogar negativ sind, andererseits an beiden Präparaten vom Hund starke Stimulierung gesehen wurde, läßt sich die Frage, wie sich das Herz des kranken Menschen verhält, nicht beantworten. Die Arbeiten der genannten Kliniker sprechen zwar für eine stärkere positiv inotrope Wirkung, die der am Hund beobachteten ähnlich ist. Welcher Anteil aber dabei auf zentralnervöse Einflüsse entfällt, ist noch unbekannt.

Summary

The effect of varying doses of theophylline on the heart-lung preparation of the cat has been studied after depression of the heart muscle by β-bromallyl-isobutylbarbituric acid.

After injections of theophylline the heart rate and the stroke volume were moderately increased, while the increase of the cardiac output (ml./min.) was slightly more pronounced. The atrial pressure fell correspondingly. The change of the competence index was not positive; the possible reason is discussed.

Results obtained with the heart-lung preparation can be analysed statistically even when the number of experiments is relatively small. Only the first response of a preparation has been used for the quantitative analysis. The variance has been reduced by expressing changes in absolute (ml.) rather than relative (per cent) units of measurement. A linear relation was observed between the response to theophylline and the logarithm of the dose. The threshold dose was 1.2 mg., the optimal dose 8 mg. The maximal response to theophylline was small compared with that to adrenaline or to ouabaine. The duration of the response was much shorter than that after ouabaine.

When the response to theophylline was studied during continuous electrical stimulation of the heart at a constant frequency, the cardiac output was found to be increased when there was no change of the

heart rate. Theophylline thus has a true but not very strong positive inotropic action.

When heart failure occured spontaneously theophylline was sometimes found to cause a stronger stimulating effect than after pretreatment with barbiturate.

In different species (cat, dog, rat) the inotropic action of Theophylline was found to correspond to its action on the isolated papillary muscle.

Wir danken Herrn O. Tilger für verständnisvolle Mitarbeit bei der Herstellung der Präparate.

Literatur

Anitschkov, S. W., u. P. Trendelenburg: Die Wirkung von Strophanthin auf das suffiziente und auf das insuffiziente Warmblüterherz. Dtsch. Med. Wochenschr. **1928**, 1672. — Anrep, E. V., and P. S. Stacey: Comparative effect of various drugs upon the coronary circulation. J. of Physiol. **64**, 187 (1927). — Bartlett, M. S.: Suppl. Journal of the Royal Statistical Society **4**, 137 (1937); zit. bei Snedecor. — Baumgartner, G., G. Grupp u. S. Jansen: Untersuchungen zu einem automatisch registrierenden Bubbleflowmeter. Pflügers Arch. **261**, 575 (1955). — Berseus, S.: The influence of heart glucosides theophylline and analeptics on the cardiac output in congestive heart failure with remarks on the acethylen methods for the determination of the arteriovenous oxygen difference. Acta med. Scand. **145**, 113 (1943). — Bodo, R.: The effect of „hearttonics" and other drugs upon the hearttone and the coronary circulation. J. Physiol. **64**, 365 (1928). — Boyer, N. H.: Aminophylline and related Xanthine derivatives. J. Amer. Med. Assoc. **122**, 306 (1943). — Boyer, N. H., and H. D. Green: The effects of nitrites and xanthines on coronary inflow and blood pressure in unaesthetized dogs. American Heart London **21**, 199 (1941). — Braun, W., K. H. Althoff u. R. Taugner: Bubbleflowmeter mit automatischer Registrierung. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 529 (1954). — Brinley, F. J.: The effect of caffeine on the prevagus and postvagus chick heart. Amer. J. Physiol. **100**, 357 (1932). — Bruner, H. D.: Bubbleflowmeter, in V. R. Potter: Meth. Med. Res. Chicago **1**, 80 (1948). — Bürgi, S.: Über die Wirkung einiger Pharmaka auf das Prävagusherz des Hühnerembryos. Arb. Staatsinst. exper. Therap., Frankfurt a/M **33**, 1 (1937); zit. nach Ber. Physiol. **99**, 668 (1937). — Catell, M., and H. Gold: Relation of the rhythm to force of the contraction of mammalian heart muscle. Amer. J. Physiol. **182**, 307 (1955). — Drill, V. A.: Pharmacology in medicine. New York 1954. — Farah, A., and G. Maresh: Determination of the therapeutic, irregularity and letal doses of cardiac glycosides in the heart-lung preparation of the dog. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **92**, 32 (1948). — Flaum, E., u. R. Rössler: Über die Herzwirkung der Purinkörper. Klin. Wschr. **1933**, 1489. — Fowell, D. M., J. A. Winslow, V. P. Sydensticker and N. C. Whiler: Circulatory and diuretic effects of theophyllineisopropanolamin. Arch. Int. Med. Chicago **83**, 150 (1949). — Furchgott, R. F., and W. Sleator: Effects of rate of stimulation, strophanthin, epinephrine and acetylcholine on contraction force and action potential of issolated guinea pig auricles. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **110**, 20 (1954). Garb, S., and M. Penna: Some quantitativ aspects of relation of rhythm to contractile force of mammalian ventricular muscle. Amer. J. Physiol. **182**, 601 (1955). — Gruhzit, C. C., and A. E. Farah: A comparison of the positive inotropic effects of ouabain and epinephrine in heart failure induced in the dog heart-lung-preparation by Na-pentobarbital, DNP, NaCN and NaN_3. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **114**, 334 (1955). —

Guggenheimer, H., u. K. Sassa: Über die Beeinflussung des Coronarkreislaufs durch Purinderivate. Klin. Wochenschr. **1923**, 1451. — Hardman, H. F., A. C. Yard and M. B. Chenoweth: The effect of the ethylendiamine component of aminophylline on the duration of reserval of cardiac failure. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **109**, 461 (1953). — Howarth, Sheila, J. McMichael and E. P. Sharpey-Schafer: The circulatory action of theophylline ethylendiamine. Clin. Sci. **6**, 125 (1947). — Huggins, R. A., C. A. Handley and M. la Forge: An evaluation of the cardiovascular effects of certain drugs in hypotensiv dogs. Amer. J. Physiol. **157**, 352 (1949). — Kiese, M., u. H. Gummel: Zur Herzwirkung des Coffeins. Klin. Wochenschr. **1938**, 927. — Knebel, R.: Die Elastizitätsverhältnisse des arteriellen Systems am Starlingschen Herz-Lungen-Präparat. Arch. exper. Path. Pharmak. **197**, 485 (1941a). — Über den Einfluß des elastischen Widerstandes auf die Kreislaufverhältnisse des Herz-Lungen-Präparates. Arch. exper. Path. Pharmak. **197**, 496 (1941b). — Knowlton, F. P., and E. H. Starling: The influence of variations in temperature and blood-pressure on the performance of the isolated mammalian heart. J. Physiol. **44**, 206 (1912). — König, W.: Herzarbeit ohne Sauerstoff. III. Herzmittelwirkung am Warmblüterherz. Arch. exper. Path. Pharmak. **127**, 349 (1927). — Kohn, R.: Zur experimentellen Veränderung der Digitalisgiftigkeit. IV. Untersuchungen am isolierten Froschherzen und am Herz-Lungen-Präparat von Katzen. Arch. exper. Path. Pharmak. **173**, 341 (1933). — Koller, S.: in Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. — Allgemeine Untersuchungsmethoden, Teil II. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer-Verlag 1955. — Krayer, O.: Versuche am insuffizienten Herzen. Arch. exper. Path. Pharmak. **162**, 1 (1931). — Krop, S.: The influence of heart stimulants on the contraction of isolated mammalian cardiac muscle. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **82**, 48 (1944). — Kuschinsky, G., u. O. Kalb: (1957); in Vorbereitung. — Kuschinsky, G., u. E. Muscholl: Die Wirkung von Theophyllin, Coffein und Theobromin auf Kontraktionskraft, Erregbarkeit, Refraktärzeit und Spontanfrequenz des isolierten Herzmuskels der Katze. Arch. exper. Path. Pharmak. **229**, 348 (1956). — Lee, K. S.: The metabolism and contraction of cat heart muscles as affected by drugs. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **112**, 484 (1954). — Linder, A.: Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. Basel: Verlag Birkhäuser 1951. — Lüllmann, H.: Die Wirkung von Coffein und Theophyllin auf den Herzmuskel. Arch. Kreislaufforsch. **23**, 12 (1955). — Markwalder, J., and E. H. Starling: On the constancy of the systolic output under varying conditions. J. Physiol. **48**, 348 (1914). — Price, H. L., and M. Herlich: Significance of the competence index in the measure of myocardial contractility. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **115**, 199 (1955a). —Price, H. L. and M. Herlich: The effect of cyclopropane, diethylether, nitrousoxyde, thiopental, and hydrogen ion concentration on the myocardial function of the dog heart-lung preparation. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **115**, 206 (1955b). — Schack, J. A., and S. H. Waxler: An ultraviolett spectrophotometric method for the determination of theophylline and theobromine in blood an tissues. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **97**, 283 (1949). — Schmid, E., M. v. Bubnoff u. R. Taugner: Zur Kreislaufwirkung der Purinkörper am wachen Hund. Vergleichende Untersuchungen mit Coffein Theobromin, Theophyllin, Euphyllin, Oxyäthyltheophyllin und Dihydrooxypropyltheophyllin. Arzneimittel-Forsch. **5**, 194 (1955). — Smith, J. R., and J. Jensen: Observations on the effect of theophylline aminoisobutanol in experimental heart failure. J. Labor a. Clin. Med. **31**, 850 (1946). — Snedecor, G. W.: Statistical methods to experiments in agriculture and biology. Iowa state College Press, 4. ed. 1950. — Starr, I., C. J. Gamble, A. Margolies, J. S. Donal,

N. Joseph and E. Eagle: A clinical study of the action of 10 commonly used drugs on cardiac output work and size; on respiration, on metabolic rate and on the electrocardiogramm. J. Clin. Invest. **16**, 799 (1937). — Starling, E. H.: Das Herz-Lungenpräparat. Hdbch. biol. Arbeitsmeth. **V, 4**, 1. Hälfte, 827 (1923). — Steinberg, F. U., and J. Jensen: The effect of theophylline aminoisobutanol on the circulation in congestive heart failure. J. Labor. a. Clin. Med. **31**, 857 (1946). — Trautwein, W., u. J. Dudel: Aktionspotential und Mechanogramm des Warmblüterherzmuskels als Funktion der Schlagfrequenz. Pflügers Arch. **260**, 24 (1954). — Wollenberger, A.: On the energy-rich phosphate supply of the failing heart. Amer. J. Physiol. **150**, 733 (1947). — Woods, J. B., J. B. Wyngaarden, B. Rennick and M. H. Seevers: Cardiovascular toxicity of thiobarbiturates: comparison of thiopental and 5-allyl-5-(1-methylbutyl)-2-thiobarbiturate (Surital) in dogs. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **95**, 328 (1949).

Professor Dr. G. Kuschinsky, Pharmakolog. Inst. d. Univ. Mainz, Langenbeckstr. 1

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 406—420 (1957)

Aus der 2. Medizinischen Universitätsklinik München
(Direktor: Professor Dr. Dr. G. Bodechtel)

Untersuchungen über das Verhalten der Meerschweinchen gegenüber verschiedenen diabetogenen Noxen. Alloxan und Dithizon

Von
Helmut Maske und Kurt Weinges

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. September 1956)

Die mehrfach beschriebene Tatsache, daß Meerschweinchen im Gegensatz zu fast allen anderen Laboratoriumstieren nach der Injektion von Alloxan keinen Diabetes bekommen, erscheint aus verschiedenen Gründen interessant. Es ist bis heute nicht bekannt, ob diese Eigenart lediglich auf einer Unempfindlichkeit gegenüber der Alloxanvergiftung beruht oder ob Meerschweinchen überhaupt keinen dauernden Diabetes bekommen. Ungeachtet dieser noch nicht beantworteten Frage wurden gar nicht selten Experimente an Meerschweinchen durchgeführt, deren Ergebnisse dann auf das Verhalten anderer Laboratoriumstiere oder gar auf das Stoffwechselverhalten des Menschen bezogen wurden. Dabei geben auch andere Untersuchungen Hinweise dafür, daß die Meerschweinchen in ihrem Stoffwechsel erheblich von dem Verhalten der übrigen Laboratoriumstiere abweichen.

Als erster stellte Goldner 1945 fest, daß Meerschweinchen keinen Alloxandiabetes bekommen [6, 7]. Degenerative Veränderungen an den Inselzellen wurden nur dann gefunden, wenn die Tiere so hohe Alloxandosen erhalten hatten, daß sie infolge allgemeintoxischer Wirkungen dieser Substanz innerhalb von 24 Std zugrunde gingen. 1947 beobachteten Saviano u. de Franciscis nur vorübergehende Blutzuckerschwankungen ähnlich denen, die bei anderen Tieren innerhalb der ersten 24 Std nach Alloxan gefunden werden [26]. West u. Highet konnten 1948 gar keine Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels feststellen [30]. Charalampous u. Hegstedt fanden lediglich histologische Veränderungen an den Langerhansschen Inseln, aber keine Stoffwechselveränderungen im Sinne eines Diabetes [2]. Sendrail, Bazex u. Bolte beobachteten ebenfalls nur histologische Veränderungen [28]. Johnson beobachtete nur vorübergehende Veränderungen des Blutzuckers und der Inselzellen [11]. Collins-Williams u. Mitarb. versuchten ohne Erfolg, einen Diabetes durch die Kombination von Pankreatektomie und Alloxaninjektion zu erzeugen [3]. Knoth fand nach Alloxangaben Störungen der reduzierenden Fermente in den Langerhansschen Inseln an Hand einer abgeschwächten Triphenyltetrazoliumchlorid-Reaktion [12]. Die letzte ausführliche Untersuchung wurde von Scherer durchgeführt, der wie die vorhergehenden Untersucher nach Alloxan nur vorübergehende Blutzuckererhöhungen beobachtete.

Die histologischen Veränderungen an den Langerhansschen Inseln zeigten keine Beziehungen zu der Intensität der Blutzuckerschwankungen und betrafen A- und B-Zellen [27].

Sämtliche Autoren führen die Resistenz der Meerschweinchen gegenüber dem Alloxan auf eine Alloxanunempfindlichkeit zurück. Eine Erklärung dafür wurde erstmals 1946 von Lazarow gegeben. Nachdem er festgestellt hatte, daß sich der Alloxandiabetes durch vorhergehende Gaben von SH-Glutathion verhindern läßt und daß Glutathion Alloxan inaktiviert [13], nahm er an, daß besondere Verhältnisse im Glutathionstoffwechsel der Meerschweinchen für deren Unempfindlichkeit gegenüber dem Alloxan verantwortlich zu machen seien. Diese Vorstellung stimmte gut mit anderen Beobachtungen überein, nach denen Alloxan einen Abfall von SH-Glutathion im Blut erzeugt und nach denen Parallelen zwischen Blutglutathionkonzentration und der Anfälligkeit verschiedener Tierarten gegenüber dem Alloxandiabetes bestehen. Basierend auf diesen Beobachtungen fand Griffith 1949, daß Meerschweinchen, die längere Zeit ohne Glutathion und Cystin ernährt worden waren, nach der Injektion von Alloxan etwas ausgeprägtere Blutzuckerveränderungen zeigen. Einen Diabetes konnte er jedoch mit Alloxan bei Meerschweinchen ebenfalls nicht erzeugen [8].

Eine andere Erklärung für die Resistenz der Meerschweinchen gegenüber der diabetogenen Alloxanwirkung gab Ferner 1952, der auf die Verteilung der A- und B-Zellen innerhalb der Langerhansschen Inseln des Meerschweinchens hinweist. Die A-Zellen seien so um die Capillaren lokalisiert, daß aus dem Blut diffundierendes Alloxan zunächst immer die vermehrt reduzierende Substanzen enthaltenden A-Zellen passieren müsse [5].

Während von den verschiedenen Autoren bisher immer nur die spezielle Resistenz der Meerschweinchen gegenüber dem Alloxan diskutiert wurde, gibt es Anhaltspunkte dafür, daß sich diese in ihrem Stoffwechsel überhaupt anders verhalten als andere Tierarten. Insbesondere scheint jedoch die Funktion und die Bedeutung des endokrinen Prankreasanteils abzuweichen.

Kobaltchlorid scheint nur bei Meerschweinchen so ausgedehnte A-Zellveränderungen zu erzeugen, wie sie von Van Campenhout und von anderen beschrieben worden sind [1, 4]. Nach Suomalainen bekommen Meerschweinchen im Gegensatz zu Igeln, Ratten und Mäusen keinen Magnesiumdiabetes [29]. Nach Untersuchungen von Marks u. Young enthält das Pankreas dieser Tiere sehr viel weniger Insulin als das der anderen Laboratoriumstiere [24]. Schließlich fand Okamoto in den Langerhansschen Inseln der Meerschweinchen im Gegensatz zu denen fast aller anderen untersuchten Tierarten mit der von ihm entwickelten histochemischen Methode kein Zink [24].

Diese Beobachtung von Okamoto war der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit, nachdem vorhergehende eigene Untersuchungen gezeigt hatten, daß enge Beziehungen zwischen dem Insulingehalt der Langerhansschen Inseln und dem dort histochemisch nachweisbaren Zink bestehen [16, 17, 18, 19]. Darüber hinaus konnte in vorhergehenden Arbeiten gezeigt werden, daß das Vorhandensein von Zink in den Langerhansschen Inseln bestimmt Voraussetzung für die Entstehung eines

Dithizondiabetes und mit einiger Wahrscheinlichkeit auch für die Ausbildung eines Alloxandiabetes ist [15, 21]. Es lag infolgedessen nahe, die Alloxanresistenz dieser Tierart auch mit dem fehlenden Inselzink in Zusammenhang zu bringen. Darüber hinaus deutet der geringere Insulingehalt im Meerschweinchenpankreas auf einen geringeren Bedarf an diesem Hormon, bei dessen Fehlen dementsprechend natürlich auch weniger Ausfallserscheinungen im Stoffwechsel zu erwarten sind.

Wir stellten uns die Aufgabe, festzustellen, inwieweit es überhaupt möglich ist, bei Meerschweinchen einen anhaltenden Diabetes mellitus zu erzeugen. Zunächst wurden die älteren Versuche über die Wirkung des Alloxans nachgearbeitet. Dabei wurde die allgemeine Toxicität der Substanz durch Vorbehandlung der Tiere mit Tokopherol, das die Alloxanhämolyse weitgehend verhindert, stark herabsetzt [9, 10, 25] und es wurden Glucosebelastungen durchgeführt, um auch Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels im Sinne eines latenten Diabetes erfassen zu können. Es wurde weiter die Wirkung von Dithizon auf die Langerhansschen Inseln und auf den Kohlenhydratstoffwechsel untersucht. Schließlich wurde versucht, ob sich Zink mit verbesserten histochemischen Methoden eventuell doch noch nachweisen läßt und inwieweit der Zinkgehalt des Gesamtpankreas der Meerschweinchen von dem der Kaninchen abweicht.

Methoden und Material

1. Es wurden mischrassige Meerschweinchen beiderlei Geschlechts verwendet. Die Tiere erhielten Mischfutter nach Belieben.

2. Blutzucker wurden nach Hagedorn-Jensen bestimmt. Das dazu notwendige Blut wurde entweder unter Verwendung mit Heparin benetzter Pipetten aus den Ohrvenen oder bei den in Narkose durchgeführten Glucosebelastungen aus den freigelegten Schenkelvenen entnommen.

3. Alloxan (Hoffmann-La Roche)* wurde in schwach saurer physiologischer NaCl-Lösung in Äthernarkose in die freigelegte Schenkelvene injiziert. Die Tiere waren etwa 12 Std vorher ohne Futter und hatten 24 Std vor Versuchsbeginn 30—50 mg Tokopherol in öliger Lösung (Hoffmann-La Roche)* i.m. injiziert erhalten, um die sonst regelmäßig durch Alloxan hervorgerufene Hämolyse zu verhindern.

4. Dithizon (Merck) wurde zunächst in ammoniakalischem Alkohol (100 mg Dithizon/1 cm^3 absol. Alkohol mit 4 Tropfen konz. Ammoniak) gelöst und dann mit dest. Wasser aufgefüllt, so daß die Alkoholendkonzentration weniger als 20% betrug. Die Dithizonlösung wurde langsamer intravenös injiziert als das Alloxan.

5. Glucosebelastungen wurden in Evipannarkose durchgeführt. Die Tiere erhielten bis zu 100 mg Evipan im Verlauf von 4 Std intravenös injiziert. Blutzucker wurden nach der intravenösen Injektion von 1 g Glucose/kg K.Gew. halbstündlich bestimmt.

* Wir danken der Deutschen Hoffmann-La Roche A.G. für freundlicherweise überlassenes Alloxan und Ephynal.

6. Histologische Untersuchungen von in Bouinscher Lösung fixierten Pankreasteilen wurden entweder mit der von Gomori angegebenen Färbung[5] oder mit einer selbst entwickelten Methode durchgeführt[20].

7. Der histochemische Nachweis von Zink wurde sowohl mit der älteren von Okamoto angegebenen Methode[23] als auch mit der nativen Dithizonfärbung[21] versucht.

8. Halbquantitative emissionsspektrographische Untersuchungen über den Gehalt von Meerschweinchen- und Kaninchenpankreas an verschiedenen Kationen wurden nach der Veraschung an gewichtsäquivalenten Gewebsteilen durchgeführt. Zur Anregung diente der Abreißbogen nach Pfeilsticker mit einem Kurzschlußstrom von 9,2 A. Belichtet wurde jeweils 30 sec.

Ergebnisse

I. Untersuchungen an Kontrolltieren

1. Blutzuckerbestimmungen. Um einen Maßstab für die normale Schwankungsbreite des Blutzuckers bei normalen Meerschweinchen zu

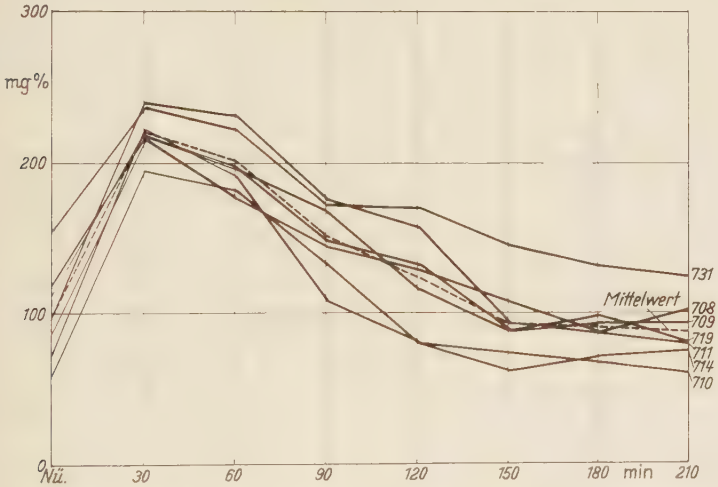


Abb. 1. Blutzucker nach i. v. Injektion von 1 g Glucose/kg K.Gew. in Evipannarkose bei gesunden Meerschweinchen. ----- Mittelwertskurve

erhalten, wurden Bestimmungen bei 52 nicht nüchternen Meerschweinchen durchgeführt. Der Mittelwert betrug 124 mg-% ± 53,4*. Blutzuckerwerte bis zu 177 mg-% wurden demnach noch als normal bezeichnet.

2. Bei 7 normalen Meerschweinchen wurden Glucosebelastungen durchgeführt. Die Tiere erhielten 1 g Glucose/kg K.Gew. in Evipannarkose

* Die mittlere Abweichung vom Mittelwert wurde nach der folgenden Formel errechnet: $\sigma = \pm \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} (M - x_1)^2}$

Angegeben ist die dreifache mittlere Abweichung.

intravenös injiziert. Anschließend wurden halbstündlich Blutzuckerwerte bestimmt. Das Ergebnis der sehr einheitlich verlaufenden Kurven ist aus Abb. 1 zu ersehen.

II. Alloxan

Es wurden zwischen 100 und 500 mg/kg K.Gew. Alloxan verabreicht. Mengen über 200 mg/kg wurden trotz der Vorbehandlung mit Vitamin E sehr schlecht vertragen. Nach älteren Beobachtungen ist die allgemeintoxische Wirkung größerer Alloxandosen auf die parenchymatösen Organe, insbesondere auf Leber und Niere so hoch, daß die Tiere daran zugrunde gehen. Nachdem sich bei anfänglichen Untersuchungen herausgestellt hatte, daß die Meerschweinchen ebenso wie z. B. Kaninchen ziemlich regelmäßig einige Stunden nach der Alloxangabe schwere Hypoglykämien mit Krämpfen bekommen, von denen sie sich nur schwer wieder erholen, wurden regelmäßig 3—4 Std nach Alloxan mehrfach 4—6 cm^3 20%ige Glucose s.c. injiziert, wobei Hyaluronidase vorgespritzt wurde, um die Resorption zu verbessern. Bei verschiedenen Tieren wurden besonders nach Applikation hoher Alloxandosen Nierenkomplikationen in Form von Harneiweiß und Rest-N-Erhöhungen bis zu 75 mg-% nachgewiesen.

1. Anfänglicher Blutzuckerverlauf. Bekanntlich beobachtet man nach Alloxangaben einen dreiphasischen Blutzuckerverlauf. Es kommt im allgemeinen zu einer kurzdauernden Hyperglykämie, deren Ursache noch nicht sicher geklärt ist. Die Leber scheint dabei eine wesentliche Rolle zu spielen. Anschließend wird ziemlich regelmäßig eine mehrere Stunden dauernde Hypoglykämie beobachtet, als deren Ursache die Freisetzung von Insulin aus den zugrunde gehenden Langerhansschen Inseln und eine Leberschädigung angenommen wird. Erst 24—48 Std nach der Alloxaninjektion bildet sich bei anderen Laboratoriumstieren die diabetische Hyperglykämie aus.

Bei drei Tieren wurden Blutzucker in den ersten Stunden nach der Alloxaninjektion untersucht. Es kam 1 bis 2 Std nach der Injektion zu Blutzuckersteigerungen, die aber 200 mg-% nicht überschritten. Eine Hypoglykämie wurde nach Alloxan ziemlich regelmäßig beobachtet und infolgedessen den Tieren Glucose prophylaktisch verabreicht. Bei sechs Tieren wurde zum Zeitpunkt des Auftretens hypoglykämischer Krämpfe der Blutzucker untersucht und Werte um 40 mg-% gefunden.

2. Das spätere Verhalten des Blutzuckers. Wie aus der Tab. 1 hervorgeht, wurden bis zu der maximalen Beobachtungsdauer von 16 Tagen nach Alloxaninjektion keine Blutzuckerwerte beobachtet, die 200 mg-% überschritten hätten. In der Tabelle wurden die Tiere nicht berücksichtigt, die innerhalb der ersten 24 Std nach der Alloxanapplikation

Nr.	K. Gew. g	Alloxan Dosis mg/kg	Blutzucker (mg-%) nach Tagen															
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
336	374	200	98	+														
341	462	150		107			102				112							
345	500	150		121					102		100			111	↓	132		116
349	740	150		148					131		125			75	+			
352	530	150		190				+										
353	450	100	118	+														
355	420	150		86			104			+								
356	480	150		77			90	+										
357	444	150	34	+														
358	440	150		81			82				107	+						
363	520	150			155	174	+											
704	840	200							116	+								
705	470	200							91	+								
720	540	200							91	+								
728	560	200	105										102	+				
729	460	200	95		+													
730	500	200	90		+													
733	455	200			41	+												
739	500	240			77			122	+									
741	540	220			103			100	+									
742	580	240			105		+											
744	420	240				173	+											
745	435	230							188	+								
746	460	220				91	+											
748	500	200							130	+								
383	500	400	134/ 98	86	+													
386	640	470	150/120	69	121		+											
701	470	500	186	+														
702	440	500	109	+														

Bemerkungen: Nr. 345 ↓ = 200 mg Alloxan/kg
Nr. 357 erhielt keine Glucose

nfolge von Krämpfen oder durch andere toxische Nebenwirkungen zugrunde gingen. Insgesamt wurden 23 Tiere erfaßt, die 150—200 mg und 4 Tiere, die 400—500 mg Alloxan/kg K.Gew. erhalten hatten. Bei einem Tier (Nr. 345) wurde ein zweites Mal Alloxan injiziert, ohne daß der Blutzucker angestiegen wäre.

3. Glucosebelastungen bei mit Alloxan vorbehandelten Meerschweinchen. Die Blutzuckerkurven nach i.v. Glucosebelastungen liegen fast alle

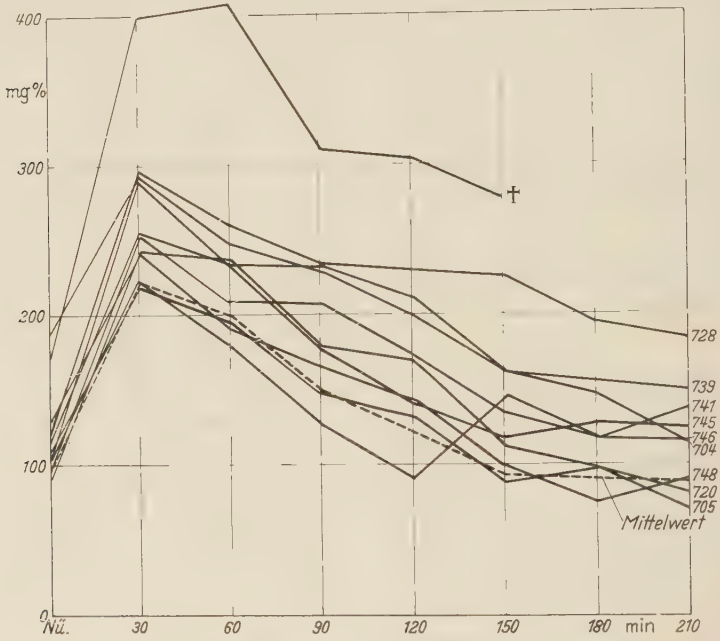


Abb. 2. Blutzucker i.v. Injektion von 1 g Glucose/kg K.Gew. in Evipannarkose bei mit 200—540 mg Alloxan/kg K.Gew. vorbehandelten Meerschweinchen. ----- Mittelwertskurve bei normalen Tieren (Abb. 1)

oberhalb der Mittelwertskurve normaler Tiere (Abb 2). Es fand sich aber kein ausgesprochen diabetisches Verhalten. Nach 3 Std lagen die Blutzuckerwerte regelmäßig unterhalb der 200 mg-%-Grenze. Lediglich ein Tier zeigt ein Verhalten, das als diabetisch gedeutet werden könnte. Der Blutzucker erreichte hier Werte bis zu 410 mg-%. Dieser Befund muß aber mit einer gewissen Reserve bewertet werden, da das Tier wahrscheinlich infolge einer Allgemeinschädigung im Verlauf der Belastung ad exitum kam.

Auf Grund der Glucosebelastungen läßt sich nur ein geringes Abweichen des Kohlenhydratstoffwechsels im Sinne eines Subdiabetes nach Alloxan feststellen.

*4. Histologische Untersuchungen**. Veränderungen an den Langerhansschen Inseln wurden in Übereinstimmung mit verschiedenen Voruntersuchern fast nur nach der Applikation hoher Alloxandosen beobachtet. 3—24 Std nach der Injektion von 400—500 mg Alloxan/kg wurden verhältnismäßig häufig Veränderungen an den Kernen der B-Zellen im Sinne einer Pyknose gefunden. Die Kerne erschienen groß, homogen und ohne Zeichnung. Ganz vereinzelt wurden weniger ausgeprägte Veränderungen an den B-Zellkernen auch nach geringeren Alloxandosen beobachtet. Veränderungen am Plasma der B-Zellen waren bei keinem Tier sicher nachzuweisen. Vereinzelt erschienen die A-Zellkerne blasig vergrößert.

III. Dithizon

Es ist bis heute nicht sicher bekannt, inwieweit bei der Entstehung des Alloxandiabetes und des Dithizondiabetes vergleichbare chemische Vorgänge zur Schädigung der Inselzellen führen. Über die Wirkungsweise des Alloxans ist man bis heute noch auf mehr oder weniger hypothetische Vorstellungen angewiesen, von denen in der Literatur am meisten die eingangs zitierten Beziehungen zum Glutathionstoffwechsel diskutiert werden. Voraussetzung für eine diabetogene Dithizonwirkung ist dagegen sicher das Vorhandensein von Zink in den Langerhansschen Inseln. Durch das Vorhandensein des Metalls kommt es zu der organspezifischen Anreicherung von Dithizon, welches dann erst sekundär seine zellfeindliche Wirkung ausüben kann. Es lassen sich auch experimentelle Beobachtungen anführen, die für einen gleichen Mechanismus bei der Entstehung des Alloxandiabetes sprechen. Es erschien infolgedessen interessant, zu untersuchen, ob der Kohlenhydratstoffwechsel der Meerschweinchen nach Dithizongaben verändert ist. Ältere Beobachtungen über das Fehlen von histochemisch nachweisbarem Zink in den Langerhansschen Inseln des Meerschweinchens ließen es zwar von vorneherein als sehr unwahrscheinlich erscheinen, daß sich bei dieser Tierart mit Dithizon ein Diabetes erzeugen läßt. Es war jedoch auch möglich, daß bereits geringe, histochemisch nicht mehr nachweisbare Mengen Zink ausreichen, um eine Dithizonwirkung zu ermöglichen.

Dithizon wurde den 12 Std hungernden Tieren in wäßriger Lösung langsam in eine freipräparierte Schenkelvene injiziert. Der Eingriff wurde in leichter Äthernarkose durchgeführt. Die Dosen lagen zwischen 40 und 76 mg/kg K.Gew. und reichen aus, um bei Kaninchen einen bleibenden Diabetes zu erzeugen. Bei einem Teil der Tiere wurden wie bei den Versuchen mit Alloxan etwa 4 Std nach der Dithizoninjektion zwischen 8 und 20 cm^3 20%ige Glucose mit Hyaluronidase s.c. injiziert. Bei verschiedenen Tieren wurden Infiltrate und Lähmungen als lokale Nebenwirkungen gefunden. Im großen und ganzen wurde Dithizon von den Meerschweinchen aber besser vertragen als Alloxan, insbesondere wurden keine

* Wir danken Herrn Dr. Eder vom Pathologischen Institut der Universität München für die Durchsicht der Präparate.

Tabelle 2. *Blutzucker nach i.v. Injektion von Dithizon*

Nr.	K.Gew. g	Dithizon Dosis mg/kg	Blutzucker (mg-%) nach Tagen												Bemerkungen
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
303	482	62	155/109		109	+										
305	682	51	126	+												
307	626	64	102			+										
308	460	76	110	+												
309	546	64			124	176	+									
316	510	68		99	+											
316a	450	60		102										+		Exitus bei Pankreatektomie
325	454	44		114					162				129		107	Erhält 2 Monate später Alloxan
318	490	50			121										+	Exitus bei Pankreatektomie
338	600	60		88												Am 9. Tag Pankreatektomie
337	500	50		104	+											
770	770	40		120		93			156	+						
771	655	40		115		93	+									
772	784	40		134		116	+									
774	738	40		99		107			+							Exitus bei einer 2. Dithizoninj.
775	510	40				100	+									
777	535	40				96	+									
779	585	40				100	+									
782	515	50				100	+									
785	476	50				84	+									

hypoglykämischen Krämpfe beobachtet. Vereinzelt durchgeführte Untersuchungen des Rest-N und der Leberfunktion ergaben auch keine pathologischen Veränderungen, wie sie nach Alloxan festgestellt wurden.

1. Das Verhalten des Blutzuckers. Der Blutzucker zeigte nach Dithizongaben, wie aus der Tab. 2 hervorgeht, noch geringere Veränderungen als nach Alloxan. Es wurden keine sicheren anfänglichen Hypoglykämien beobachtet. Im Verlauf der weiteren Beobachtung war der höchste überhaupt festgestellte Blutzuckerwert 176 mg-%.

2. Glucosebelastungen bei mit Dithizon vorbehandelten Meerschweinchen. Der Blutzucker lag nach intravenöser Gabe von 1 g Glucose/kg K.Gew.

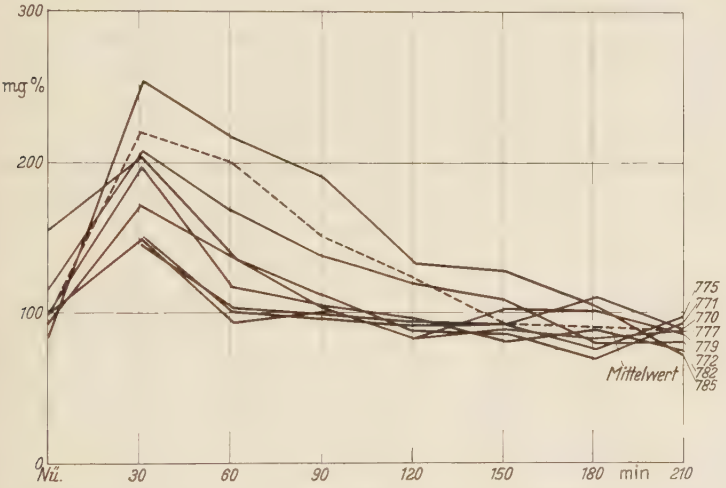


Abb. 3. Blutzucker nach i.v. Injektion von 1 g Glucose/kg K.Gew. in Evipannarkose bei mit 40 bis 50 mg Dithizon/kg K.Gew. vorbehandelten Meerschweinchen. ----- Mittelwertskurve bei normalen Tieren (Abb. 1)

im Bereich der Werte von Kontrolltieren und zum Teil darunter (Abb. 3). Ein diabetisches Abweichen der Blutzuckerkurve wurde bei keinem der acht Tiere beobachtet.

3. Histologische Untersuchungen. Veränderungen an den Langerhansschen Inseln in Form von Kernpyknosen, Änderungen der Plasmastruktur und Zelluntergängen wurden bei keinem Tier gefunden.

IV. Histochemische Untersuchungen und spektrographische Analysen des Meerschweinchenpankreas

Das abweichende Verhalten der endokrinen Pankreasfunktion beim Meerschweinchen findet seinen Ausdruck auch in dem Ergebnis histochemischer Untersuchungen. Okamoto, der als erster histochemische Beobachtungen über das Zink mit einer von ihm selbst entwickelten Methode durchführte, fand bereits, daß sich die Langerhansschen Inseln

im Meerschweinchenpankreas im Gegensatz zu denen anderer Tierarten nicht mit Diphenylthiocarbacid anfärbten. Nun besitzt diese Methode Mängel, die insbesondere in einer geringeren Empfindlichkeit im Vergleich mit neueren Methoden bestehen. Deshalb wurden diese Arbeiten mit der leistungsfähigeren intravitalen Dithizonmethode nachgearbeitet.

1. Histochemische Untersuchungen. Es gelang weder mit der älteren von Okamoto angegebenen postmortalen Methode noch mit der von uns entwickelten und seit langem verwendeten intravitalen Dithizonmethode, die sehr viel distinktere Bilder ergibt, eine mikroskopisch nachweisbare Farbreaktion zu erzielen. Es konnte auch dann kein positives Resultat gewonnen werden, wenn die Tiere 1—2 Tage vorher gehungert hatten, was bei anderen Tierarten zu einer Vermehrung des Inselzinks führt. Die Verwendung von monochromatischem Licht führte ebenfalls nicht weiter. Versuche, eine subjektiv nicht mehr nachweisbare Farbtönung noch durch mikrospektrophotometrische Messungen zu objektivieren, scheiterten vielleicht an der nicht ausreichenden Empfindlichkeit des Gerätes.

Das negative Ergebnis erlaubt natürlich nur die Aussage, daß eine für den histochemischen Nachweis notwendige untere Schwellenkonzentration nicht vorhanden ist. Wie wir kürzlich durch die Analyse der verschiedenen Zellfraktionen von ziemlich reinem Inselgewebe zeigen konnten, entsprechen die bei der histochemischen Reaktion auf Zink dargestellten Granula nur einem Teil des in den Zellen vorhandenen Metalls, das hier zusammen mit dem Insulin in Teilchen mit der Größe von Mitochondrien lokalisiert ist. Ein weiterer erheblicher Teil des Zinks findet sich in den Zellbestandteilen, die infolge ihres niederen optischen Auflösungsvermögens unter dem normalen Lichtmikroskop keine Struktur mehr zeigen [22]. Das hier in geringerer Konzentration vorliegende Zink entzieht sich dem subjektiven Nachweis. Nachdem das Meerschweinchenpankreas auch sehr wenig Insulin im Vergleich zu anderen Tieren enthält, bestätigt das Fehlen von histochemisch nachweisbarem Zink die älteren Beobachtungen über enge Beziehungen zwischen Insulin und Zink in den Langerhansschen Inseln.

2. Halbquantitative emissionsspektrographische Untersuchungen an veraschtem Pankreas von Meerschweinchen und Kaninchen. Ausgehend von der Vorstellung, daß beim Meerschweinchen womöglich ein anderes Metall die Rolle des Zinks übernommen haben könnte, wurden die im Folgenden geschilderten emissionsspektrographischen Analysen an verascht em Meerschweinchenpankreas und vergleichsweise an Kaninchenpankreas durchgeführt. Bei der feuchten Veraschung wurde besonders darauf geachtet, daß der Kölbcheninhalt nicht soweit erhitzt wurde, daß eine trockene Destillation der Metallsalze befürchtet werden mußte. Es wurden gewichtsäquivalente Mengen der Veraschungsrückstände auf die Spektralkohlen aufgetragen. Zur Kontrolle wurden außerdem gewichtsäquivalente Mengen von hinzugefügtem Cadmium mitverascht.

Bei der emissionsspektrographischen Untersuchung* zeigte sich, daß die Zinkkonzentration im Gesamtpankreas bei Kaninchen und Meerschweinchen innerhalb einer Fehlergrenze von etwa $\pm 30\%$ vergleichbar ist. In den Drüsen beider Tierarten fanden sich ebenfalls in gleichen Größenordnungen Mg, Cu, Fe, Ca, Na und K. Im Kaninchenpankreas fand sich etwas mehr Al. Nicht sicher nachweisbar waren Mn, Co, Ni, As, Pb, Hg und Ag. Größere Differenzen in dem Kationengehalt der Bauchspeicheldrüsen von Kaninchen und Meerschweinchen konnten demnach nicht festgestellt werden. Die unterschiedlichen histochemischen Befunde im Hinblick auf das Zink können infolgedessen auf den Bereich der Langerhansschen Inseln beschränkt werden. Auch größere Unterschiede in deren Zusammensetzung haben keinen merkbaren Einfluß auf die Gesamtanalyse, weil das Inselgewebe nur 1—2% der Gesamtdrüsen ausmacht.

Diskussion der Ergebnisse

Die bekannte Resistenz der Meerschweinchen gegenüber der diabetogenen Alloxanwirkung wurde bisher nur unter dem Blickwinkel einer spezifischen Alloxanwirkung diskutiert. Nun läßt sich bei dieser Tierart aber auch mit anderen diabetogenen Noxen kein bleibender Diabetes erzeugen. Wenn man außerdem berücksichtigt, daß das Pankreas der Meerschweinchen wesentlich weniger Insulin enthält als das Pankreas anderer Tiere, verschiebt sich die Problematik. Die Differenzen zwischen dem Stoffwechsel der Meerschweinchen und dem anderer Laboratoriumstiere gehen über eine Alloxanresistenz hinaus.

Obwohl die Tiere nach einer Vorbehandlung mit α-Tocopherol bis zu 200 mg Alloxan/kg K.Gew. regelmäßig überlebten, konnte keine stärkere Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel erzielt werden, als sie bereits früher beschrieben wurde. Die auch bei anderen Tierarten wenige Stunden nach der Alloxangabe auftretenden Hypoglykämien, die von älteren Autoren auf eine Insulinausschüttung aus den zugrunde gehenden B-Zellen zurückgeführt wurden, konnten auch beim Meerschweinchen regelmäßig beobachtet werden. Die geringen histologischen Veränderungen, die wir an den Langerhansschen Inseln dieser Tiere fanden, sprechen gegen die angeführte Erklärung. Nachdem in keinem Fall Zelluntergänge oder sichere Veränderungen des Zellplasmas festgestellt wurden, kann die Hypoglykämie nach Alloxan auch kaum mit dem Freiwerden von Insulin aus zugrunde gehenden Inselzellen erklärt werden. Die Hypoglykämie muß demnach mindestens zum Teil andere Ursachen haben, z. B. eine Schädigung der Leber. Bei Glucosebelastungen, die in dieser Form bei mit Alloxan vorbehandelten Meerschweinchen bisher

* Wir danken Herrn von Ohr vom physikalischen Institut der Universität München (Direktor: Professor Dr. W. Gerlach) für die Durchführung der emissionsspektrographischen Analysen.

nicht durchgeführt wurden, lagen die Blutzuckerkurven fast durchweg über dem Durchschnitt normaler Kurven bei Kontrolltieren. Der Verlauf der Blutzuckerkurven nach Alloxan berechtigt jedoch noch nicht dazu, das Vorliegen eines Diabetes anzunehmen. 3 Std nach der Glucosegabe lagen die Blutzucker mit Ausnahme eines Tieres, das außerdem während des Versuches einging, unter 200 mg-%.

Dithizon hatte in sonst diabeteserzeugenden Dosen eine noch geringere Wirkung als Alloxan. Es wurden keine schweren Hypoglykämien, nicht das geringste Abweichen der Blutzuckerkurven nach Glucosebelastung und gar keine histologischen Veränderungen beobachtet. Nachdem die Dithizonwirkung in den Langerhansschen Inseln sicher an die Gegenwart von Zink gebunden ist[31], kann das Fehlen jeder Wirkung hinreichend mit dem Fehlen von histochemisch nachweisbarem Zink erklärt werden.

Man kann aus den Ergebnissen unserer Untersuchungen schließen, daß die diabetogene Wirkung von Alloxan und von Dithizon auf gleiche chemische Vorgänge in den Inselzellen zurückzuführen ist und daß das Zink beiden Substanzen als Reaktionspartner dient. Für die Beziehung zwischen Alloxanwirkung und Zink sprechen verschiedene ältere eigene Beobachtungen. Nach Alloxan wird vermehrt Zink mit dem Harn ausgeschieden[15]. Nach weitgehender Eliminierung des Zinks aus den Langerhansschen Inseln durch intensive Glucosebelastungen[19a] oder durch Adrenalingaben[18] verliert Alloxan seine B-Zellen-zerstörende und diabetogene Wirkung weitgehend. Als Argument gegen diese Vorstellung läßt sich u. a. die Frage aufwerfen, warum bei Ratten, deren A-Zellen wesentlich mehr Zink enthalten als deren B-Zellen, durch Alloxan nur die B-Zellen zerstört werden. Die Vorgänge, die der selektiven Alloxanwirkung auf die B-Zellen zugrundeliegen, sind sicher wesentlich komplizierter als bei der Entstehung des Dithizondiabetes. Das Zink mag bei der Ausbildung des Alloxandiabetes zwar eine Bedeutung haben, aber es ist sicher nicht der allein ausschlaggebende Faktor.

Das Fehlen von histochemisch nachweisbarem Zink in den Langerhansschen Inseln der Meerschweinchen entspricht nach unseren Erfahrungen dem geringen Insulingehalt des Meerschweinchenpankreas, wie er von Marks u. Young nachgewiesen wurde[14]. Diese Eigentümlichkeiten der Inselzellen beim Meerschweinchen können zwar vielleicht das Fehlen der Alloxan- und Dithizonwirkung erklären, sie lassen aber vorläufig keine Deutung zu, warum sich beim Meerschweinchen auch mit anderen Methoden kein Diabetes erzeugen läßt.

Zusammenfassung

1. Ältere Untersuchungen, nach denen mit Alloxan bei Meerschweinchen im Gegensatz zu anderen Laboratoriumstieren kein Diabetes erzeugt werden kann, wurden bestätigt. Einige Stunden nach der Injektion

von Alloxan kam es ziemlich regelmäßig zu hypoglykämischen Krämpfen. Ein Anstieg des Blutzuckers im Sinne eines Diabetes wurde jedoch in keinem Fall beobachtet. Die Blutzuckerkurven nach i.v. Glucosegaben lagen bei den mit Alloxan vorbehandelten Tieren zwar etwas höher als bei denen von Kontrolltieren; es wurde aber kein ausgesprochen diabetischer Verlauf gefunden. Histologische Veränderungen an den Langerhansschen Inseln konnten nur nach sehr hohen Alloxandosen, vor allem in Form pyknotischer Kernveränderungen in den B-Zellen nachgewiesen werden.

2. Auch mit Dithizon konnte bei Meerschweinchen kein Diabetes erzeugt werden. Es kam auch nicht zu stärkeren Blutzuckerschwankungen kurz nach der Injektion von Dithizon; insbesondere wurden keine Hypoglykämien beobachtet. Bei Glucosebelastungen zeigten die Blutzuckerkurven mit Dithizon behandelter Tiere ein normales Verhalten. Histologische Veränderungen an den Langerhansschen Inseln wurden bei keinem Tier gefunden.

3. Histochemisch konnte weder mit der von Okamoto angegebenen noch mit einer verbesserten Methode Zink in den Langerhansschen Inseln nachgewiesen werden.

4. Halbquantitative emissionsspektrographische Untersuchungen am veraschten Gesamtpankreas ergaben, daß Zn, Mg, Cu, Fe, Ca, Na und K bei Meerschweinchen und Kaninchen in derselben Größenordnung vorhanden sind. Die histochemisch nachweisbaren Unterschiede im Zinkgehalt der Langerhansschen Inseln bei Meerschweinchen und bei Kaninchen können infolgedessen auf den Bereich der Inseln eingeschränkt werden.

Wir danken der deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung der Arbeit.

Literatur

[1] van Campenhout, E., G. Cornelis et Th. Deulin: Ann. d'Endocrin. **15**, 89 (1954). — [2] Charalampous, F. C., and D. M. Hegstedt: Proc. Soc. Exper, Biol. a. Med. **70**, 207 (1949). — [3] Collins-Williams, J., A. E. Renold and A. Marble: Endocrinology (Springfield, Ill). **46**, 1 (1950). — [4] Creutzfeldt, W., u. W. Schmidt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 487 (1954). — [5] Ferner, H.: Das Inselsystem des Pankreas. Stuttgart: Thieme 1952. — [6] Goldner, M. G., and G. Gomori: Proc. Amer. Diab. Assoc. **4**, 89 (1944). — [7] Goldner, M. G.: Bull. New York Acad. Med. **21**, 44 (1945). — [8] Griffiths, M.: Endocrinology (Springfield, Ill.) **48**, 117 (1951). — [9] Györgi, P., and C. S. Rose: Science (Lancaster, Pa.) **108**, 716 (1948). — [10] Györgi, P., and C. S. Rose: New Acad. Sci. **52**, 231 (1949). — [11] Johnson, D. D.: Endocrinology (Springfield, Ill.) **46**, 135 (1950). — [12] Knoth, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 364 (1953). — [13] Lazarow, A.: Physiologic. Rev. **29**, 48 (1949). — [14] Marks, H. P., and F. G. Young: Nature (Lond.) **146**, 31 (1940). — [15] Maske, H., H. P. Wolff, B. Stampfl u. F. Baumgarten: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 457 (1952). — [16] Maske, H.: Z. Naturforsch. **8b**, 96 (1953). — [17] Maske, H., H. P. Wolff u. B. Stampfl:

Klin. Wschr. **1953**, 79. — [18] Maske, H., B. Stampfl u. H. Gahn: Z. klin. Med. **152**, 68 (1953). — [19] Maske, H.: Experientia (Basel) **11**, 122 (1955). — [19a] Maske, H., H. Wolff u. B. Stampfl: Klin. Wschr. **1953**, 79. — [20] Maske, H.: Klin. Wschr. **1955**, 1058. — [21] Maske, H.: Metabolism (im Druck). — [22] Maske, H., K. Munk, J. D. H. Homan, J. Bouman u. R. Matthijsen: Z. Naturforsch. **11**b, 407)1956). — [23] Okamoto, K.: Transact. Soc. Path. Jap. **32**, 99 (1942). — [24] Okamoto, K.: Transact. Soc. Path. Jap. **33**, 247 (1943). — [25] Rose, C. S., and P. Györgi: Blood **5**, 1062 (1950). — [26] Saviano, M., and P. de Franciscis: Boll. Soc. ital, Biol. sper. **23**, 307 (1947). — [27] Scherer, J.: Acta anat. (Basel) **23**, 350 (1955). — [28] Sendrail, M., A. Bazex et N. Bolte: C. r. Soc. Biol. (Paris) **143**, 978 (1949). — [29] Suomalainen, P.: Ann. Acad. Sci. fenn. **60**, 433 (1955). — [30] West, E. S., and D. M. Highet: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **68**, 60 (1948). — [31] Wolff, H. P., H. Maske, B. Stampfl u. F. Baumgarten: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 440 (1952). — [32] Wolff, H. P., u. D. Ringleb: Z. exper. Med. **124**, 236 (1954).

Dr. Kurt Weinges, II. Med. Klinik der Univ. München, Ziemssenstr. 1a

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 421—431 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Über die Oxydation des Hämoglobins mit Hypochlorit

Studien über Methämoglobinbindung

XXXIII. Mitteilung*

Von

W. Heubner †, W. Junge und W. Koransky

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. Februar 1957)

Heubner u. Jung konnten 1941 nachweisen, daß die Bildung von Hämiglobin durch Chlorat in einer autokatalytisch beschleunigten Reaktion erfolgt. Primär vorhandenes Hämiglobin dient hierbei als Katalysator, und seine Konzentration bestimmt die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion. Nach der seinerzeit geäußerten Ansicht sind die niedrigeren Oxydationsstufen des Chlors, das Chlorit-Ion und das Hypochlorit-Ion, bei Einwirkung auf das Hämoglobin in der Lage, Hämiglobin in direkter Reaktion zu bilden. Vor allem das Hypochlorit schien diese Umwandlung mit großer Geschwindigkeit in stöchiometrischem Verhältnis zu vollziehen, so daß durch ein Oxydationsäquivalent Hypochlorit ein Fe^{II} zu Fe^{III} oxydiert werden sollte. Bei Fortführung dieser Arbeiten [Koransky (*a*)] ergab sich, daß auch das Chlorit in gleicher Weise wie das Chlorat *nicht* zur direkten Hämiglobinbildung fähig ist. Es kommt hier ebenfalls zu einer autokatalytischen Reaktion, deren Anfangsgeschwindigkeit durch das vorgebildete Hämiglobin bestimmt ist. Hieraus ging hervor, daß nur das Hypochlorit imstande ist, das Fe^{II} des Hämoglobins zum Fe^{III} des Hämiglobins zu oxydieren. Weiterhin zeigte sich, [Koransky (*b*)] daß sich bei der Einwirkung von Hypochlorit die Gesamtkonzentration des Blutfarbstoffes verringert. Diese Tatsache deutet darauf hin, daß ein Teil der Oxydationsäquivalente in gleichzeitig ablaufenden Nebenreaktionen verbraucht wird. Auf Grund dieser Befunde war es wünschenswert, die Reaktionsweise des Hypochlorits mit dem Hämoglobinmolekül näher zu untersuchen, mit dem Ziel, Teilreaktionen kennen zu lernen, denen bei der katalytischen Chlorat-Oxydation eine Bedeutung zukommt.

* XXXI. Mitteilung: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 324 (1949).

XXXII. Mitteilung: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 479 (1955). — Vgl. auch Heubner, Wahler, Ziegler: Hoppe-Seylers Zschr. f. physiol. Chemie **295**, 397 (1953).

Methodik

Bei allen Versuchen kam Pferdehämoglobin zur Verwendung. Die Erythrocyten wurden mit isotonischer NaCl-Lösung gewaschen und anschließend mit Toluol hämolysiert. Die weitere Reinigung des Hämolysats geschah durch Behandlung mit Tonerde-Gel nach Marshall u. Welker. Hierdurch ergaben sich klare, konzentrierte Hämoglobinlösungen mit weniger als 1% Hämiglobin, die bei Halbsättigung mit Ammonsulfat keine Trübung erkennen ließen.

Die Hämo- und Hämiglobinbestimmung erfolgte am Beckman-Spektralphotometer nach der von Havemann, Jung u. v. Issekutz angegebenen Cyanid-Methode bei 630 mμ. Die so ermittelten Extinktionsdifferenzen waren ein relatives Maß für das sich jeweils ergebende Verhältnis vom Hämiglobin zum vorhandenen Gesamt-Hämoglobin. Die absolute Hämoglobinkonzentration wurde nach Umwandlung des gesamten Blutfarbstoffs in Hämiglobin-Cyanid aus der bei 540 mμ gemessenen Extinktion mit Hilfe des von Meyer-Wilmes u. Remmer angegebenen spezifischen Extinktionskoeffizienten von 11,0 errechnet.

Das benutzte Oxydationsmittel war eine im Handel erhältliche Lösung von Natriumhypochlorit. Der Gehalt an Oxydationsäquivalenten wurde durch Titration des aus einer essigsauren Kaliumjodidlösung durch Hypochlorit freigesetzten Jods mit Natriumthiosulfat bestimmt.

Bei den einzelnen Versuchen wurde jeweils der in Puffer gelöste Blutfarbstoff mit abgestuften Mengen Hypochlorit versetzt und der Ablauf der einsetzenden Reaktion über einen bestimmten Zeitraum verfolgt. Die Hypochlorit-Konzentration wurde von 1—40 Val auf 1 Val Eisen (Äquivalentgewicht des Hämoglobins = 16800) variiert. Die Hämoglobin-Endkonzentration der Ansätze betrug stets $2{,}4 \cdot 10^{-7}$ Val/cm^3. Ein Versuchsansatz hatte nachstehende Zusammensetzung:

20,0 cm^3 m/15 Phosphatpuffer nach Sörensen p_H 6,8, 70,0 cm^3 destilliertes Wasser, 5,0 cm^3 Hämolysat.

Zum Zeitpunkt „0" erfolgte der Zusatz der jeweils gewählten Hypochloritmenge und sogleich Auffüllung mit Aqua dest. ad 100 cm^3.

Die während der Reaktion ablaufende Spontanoxydation wurde durch gleichzeitiges Messen eines analogen Ansatzes ohne Oxydationsmittel bestimmt.

Ergebnisse

Die Messungen erfolgten zunächst im Hämiglobinmaximum bei 630 mμ. Die hier erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 1 graphisch dargestellt. Auf der Abszisse wurde die Zeit in Minuten, auf der Ordinate die jeweiligen, der Aufhellung entsprechenden Extinktionsdifferenzen aufgetragen. Der maximale Aufhellungswert nach einer völligen Umwandlung in Hämiglobin betrug E = 0,832. Die Spontan-Hämiglobinbildung wurde bei allen Werten in Abzug gebracht. Aus der Abbildung ist zu ersehen, daß die Reaktion des Hämoglobins mit Hypochlorit im Gegensatz zu den Reaktionen mit Chlorit und Chlorat ihre maximale Geschwindigkeit zu Beginn besitzt und nach etwa 30—45 min annähernd zum Stillstand kommt. Es fällt auf, daß durch die niederen Hypochloritwerte 1 und 5 Val eine größere Hämiglobinbildung hervorgerufen wird als durch die Konzentrationen 10, 20 und 40 Val pro Val Eisen. Die größte Hämiglobinbildung tritt bei einem Hypochloritüberschuß von nur 5 Äquivalenten ein. Nach einer Reaktionszeit von 60 min werden jedoch nur etwa 18% der theoretisch möglichen Hämiglobinbildung erreicht.

Bei diesen Versuchen wurde gleichzeitig zu den einzelnen Zeitpunkten der Hämiglobinbestimmung das noch vorhandene Gesamt-Hämoglobin (Summe von Hämo- und Hämiglobin) gemessen. Diese Ergebnisse sind

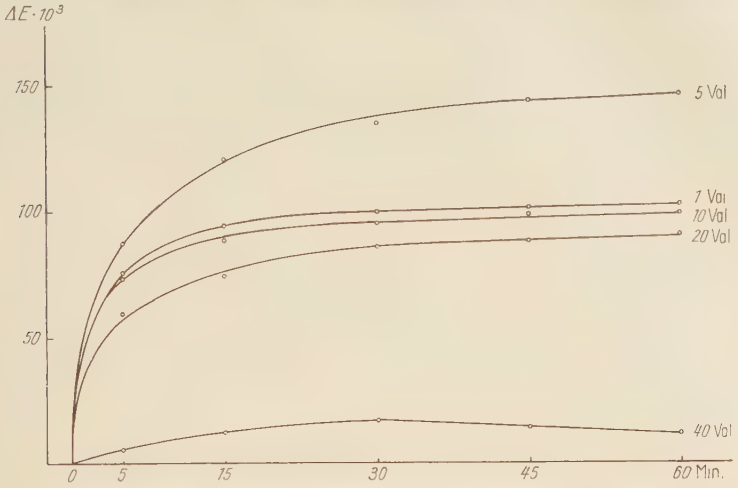


Abb. 1. Hämiglobinbildung durch Hypochlorit nach Abzug der Werte durch Spontanoxydation. Blutfarbstoff-Endkonzentration = $2{,}4 \cdot 10^{-7}$ Val/cm³. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: Extinktionsdifferenzen

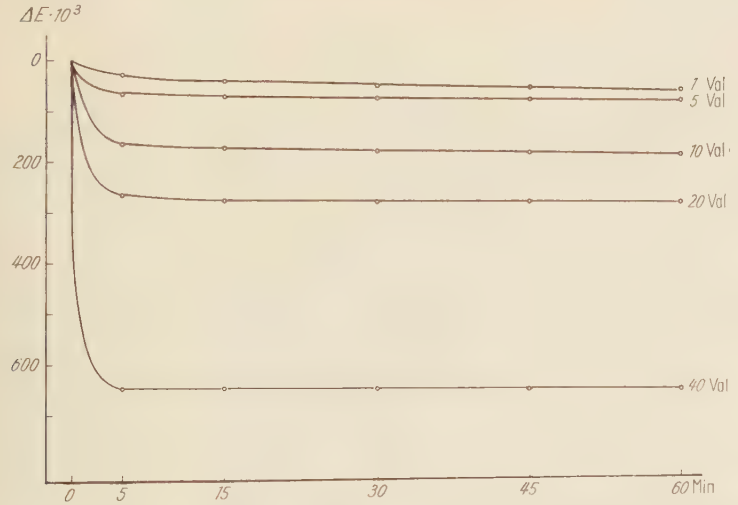


Abb. 2. Abnahme des Gesamt-Hämoglobins nach Hypochlorit-Einwirkung. Blutfarbstoff-Endkonzentration = $2{,}4 \cdot 10^{-7}$ Val/cm³. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: Extinktionsdifferenzen

aus Abb. 2 zu ersehen (Anordnung der graphischen Darstellung wie bei Abb. 1). Die Messungen lassen eine mit der Oxydation des zweiwertigen Eisens gleichzeitig ablaufende weitere oxydative Umwandlung eines

Teils des vorhandenen Hämoglobins erkennen. Das Hämoglobinmolekül wird hierbei so verändert, daß es mit der beschriebenen Bestimmungsmethode nicht mehr erfaßt werden kann. Das Ausmaß dieser Zerstörung ist abhängig von der Konzentration des zugesetzten Hypochlorits.

Sowohl die Hämiglobinbildung als auch die Zerstörung des Blutfarbstoffs durch Hypochlorit kommen nach relativ kurzer Zeit zum Stillstand. Dies kann auf der Einstellung eines Gleichgewichts oder auf dem

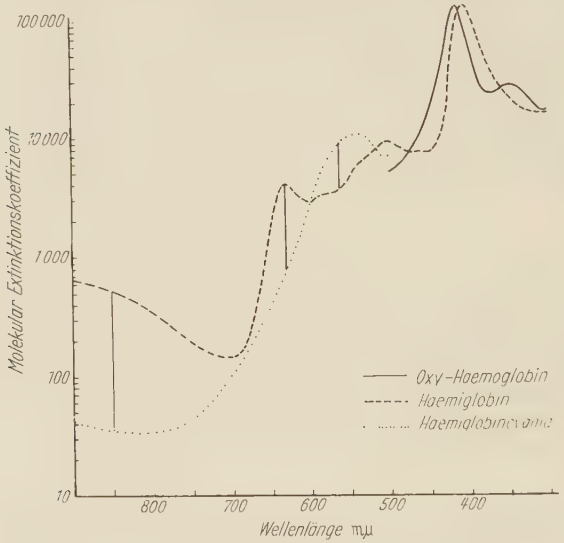


Abb. 3. Absorptionsspektren von Sauerstoff-Hämoglobin, Hämiglobin und Hämiglobincyanid Durch Striche markiert: die zur Messung benutzten Extinktions-Differenzen. Abszisse: Wellenlänge in mμ. Ordinate: Molare Extinktionskoeffizienten

völligen Verbrauch des Oxydationsmittels beruhen. Zur Klärung dieser Frage wurde bei zwei verschiedenen Hypochloritkonzentrationen die Abnahme des Oxydationsmittels während der Reaktion gemessen. Hierzu wurde die auf Berthelot zurückgehende, von Van Slyke zur Ammoniakbestimmung empfohlene Indophenol-Reaktion verwendet. Die beim Zusammenwirken von Phenol, Ammoniak und Hypochlorit entstehende Blaufärbung diente als Maß für die vorhandene Hypochloritmenge. Die Messungen erfolgten im Absorptionsmaximum des blauen Farbstoffs bei 635 mμ. Diese Bestimmungen, welche bei Hypochloritkonzentrationen von 10 und 20 Val je Val Fe ausgeführt wurden, zeigten, daß bereits nach einer Einwirkungszeit von 5 min etwa 80% des eingesetzten Oxydationsmittels nicht mehr nachweisbar waren, während nach Ablauf von 60 min noch ungefähr 10% des Hypochlorits gefunden wurden.

Nach diesen Befunden erschien es von Bedeutung festzustellen, welche reaktionsfähigen Gruppen des Hb-Moleküls neben dem zweiwertigen

Eisen das in so großem Überschuß verbrauchte Oxydationsmittel zu reduzieren vermögen. Es war anzunehmen, daß auch der Eiweißanteil des Blutfarbstoffmoleküls beteiligt ist. Zur Klärung dieser Frage war jedoch eine neue Methode erforderlich, deren Ergebnisse später mitgeteilt werden sollen.

Zunächst wurde untersucht, ob infolge von oxydativen Veränderungen am Porphyrinringsystem neben Hämiglobin auch Verdo- oder Verdiglobin-Verbindungen auftreten. Diese können bei dem hier benutzten Meßverfahren unerkannt bleiben und die Messung verfälschen, wenn sie wie Hämiglobin durch KCN bei 630 mμ eine

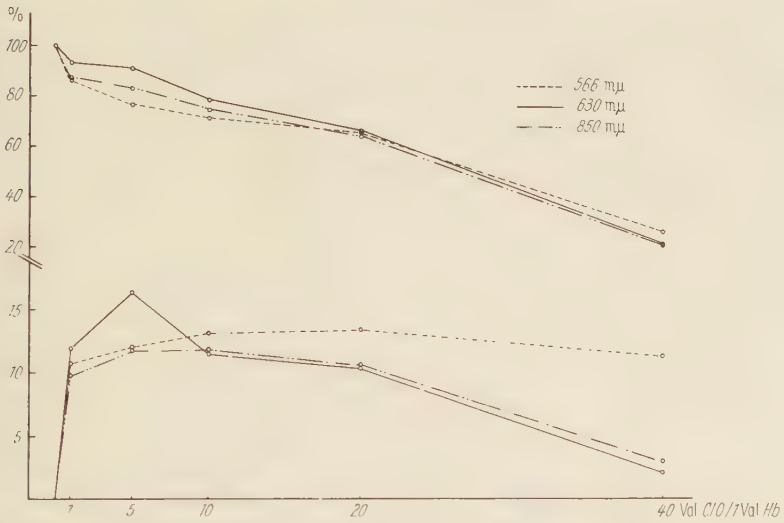


Abb. 4. Hämiglobin-Bildung (unten) und Abnahme des Gesamt-Hämoglobins (oben) nach Hypochloriteinwirkung bei 3 verschiedenen Wellenlängen gemessen. Abszisse: Hypochloritkonzentration pro Val Hb. Ordinate: Umgewandeltes Hämoglobin in Prozent des vor der Reaktion vorhandenen Hämoglobins

Erniedrigung ihrer Extinktion erfahren. Entsteht bei der Oxydation nur Hämiglobin, dann wird sich bei Ablauf der Reaktion die Extinktion an allen Stellen des Spektrums um den gleichen prozentualen Anteil der Anfangs-Extinktion ändern. Bilden sich jedoch mehrere Substanzen, dann werden sich die prozentualen Extinktionsänderungen bei verschiedenen Wellenlängen unterscheiden. Durch gleichzeitige Beobachtung der Reaktionen an drei charakteristischen Stellen des Spektrums mußte daher die Differenzierung möglich sein, ob die Oxydationswirkung des Hypochlorits an der prosthetischen Gruppe des Hb eindeutig nur auf das Fe beschränkt bleiben, oder ob weitere Reaktionen am Porphyrinring ablaufen.

Die in Abb. 3 wiedergegebenen Absorptionsspektren lassen erkennen, daß sich außer bei 630 mμ auch bei den Wellenlängen 566 mμ und 850 mμ günstige Extinktionsdifferenzen zur Durchführung solcher Messungen ergeben. Die bei den ververschiedenen Wellenlängen um fast zwei Zehnerpotenzen variierenden spezifischen Extinktionen machten eine Anpassung der Versuchsanordnung an den Meßbereich des Spektralphotometers notwendig. Diese erfolgte durch Veränderung der Schichtdicke bei den einzelnen Messungen.

Die Ergebnisse der Versuche bei allen drei Wellenlängen sind in der Abb. 4 zusammengefaßt. Auf der Abszisse sind die auf 1 Val Hämoglobin einwirkenden Hypochloritmengen aufgetragen, auf der Ordinate wurde die nach 30minütiger Reaktionszeit erreichte Umwandlung des Blutfarbstoffs in Prozent des vor der Reaktion vorhandenen Gesamthämoglobins eingezeichnet. Die infolge der Spontanoxydation hervorgerufene Hämiglobinbildung wurde jeweils abgezogen. Bei einem Vergleich dieser Ergebnisse miteinander sind deutliche Differenzen zu erkennen, obwohl

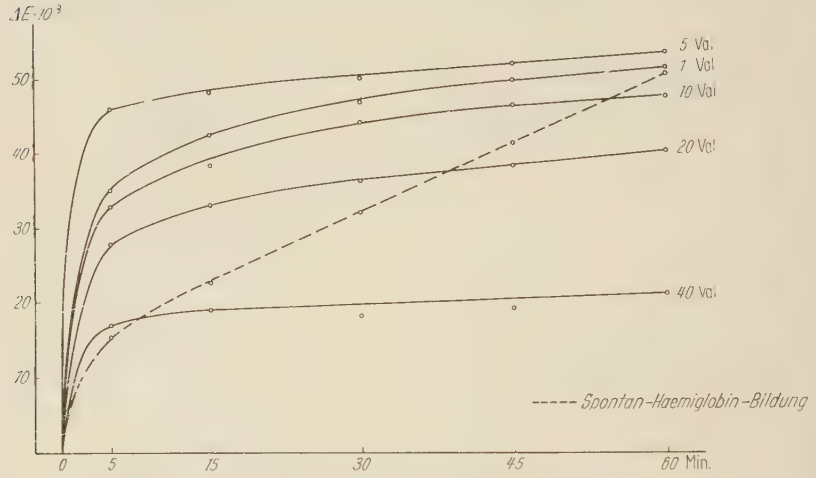


Abb. 5. Hämiglobinbildung durch Hypochlorit ohne Abzug der Werte durch Spontanoxydation. Blutfarbstoff-Endkonzentration = $2{,}4 \cdot 10^{-7}$ Val/cm³. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: Extinktionsdifferenzen

mit der angewandten Methode nur Substanzen erfaßt werden, die in gleicher Weise wie das Hämiglobin durch Kaliumcyanid eine Veränderung ihres Absorptionsspektrums erleiden. 5 Val Hypochlorit bewirken die maximale Extinktionsänderung durch Kaliumcyanid bei 630 mμ, während bei höheren Hypochlorit-Konzentrationen die Extinktionsdifferenzen bei dieser Wellenlänge wieder kleiner werden. Bei 566 und 850 mμ rufen 5 Val Hypochlorit eine geringere Extinktionsänderung durch Kaliumcyanid als bei 630 mμ hervor; höhere Konzentrationen führen zu einer Anpassung des Verhaltens des Blutfarbstoffs bei 850 mμ an das bei 630 mμ, während die Aufhellung durch Kaliumcyanid bei 566 mμ nahezu unverändert hoch bleibt. Die gleichfalls bei den 3 Wellenlängen gemessene Abnahme des Gesamthämoglobins läßt an den verschiedenen Stellen des Spektrums nur geringfügige Unterschiede erkennen.

Einige der zuletzt beschriebenen Messungen bei 630 mμ wurden aus technischen Gründen in gleicher Anordnung nur unter Herabsetzung der Konzentration aller Reaktionspartner auf ein Fünftel durchgeführt. Hierbei ergab sich ein völlig

verändertes Bild gegenüber den vorangegangenen Versuchen. Der Verlauf der Hämiglobinbildung stimmte mit den bisherigen Ergebnissen nur dann überein, wenn die neben der Hypochloritoxydation gleichzeitig ablaufende Spontanoxydation nicht berücksichtigt wird (s. Abb. 5). Werden die Ergebnisse wie bisher unter Abzug der hier außerordentlich hohen Werte der Spontanoxydation berechnet, so zeigt sich, daß im Verlauf der Reaktion bei einem Teil der Versuche durch Spontanoxydation mehr Hämiglobin gebildet wird als durch Hypochlorit. Dieses nicht erwartete Ergebnis scheint einen Einblick in die Reaktionsverhältnisse bei der Spontanoxydation zu geben, auf die später noch eingegangen werden soll.

Aus den vorangegangenen Versuchen ergibt sich, daß bei der Hypochloriteinwirkung auf das Hämoglobin neben dem Valenzwechsel des Eisens mit großer Wahrscheinlichkeit auch oxydative Veränderungen am Porphyrinringsystem auftreten.

Jope hat festgestellt, daß sich bei chemischen Abwandlungen der konjugierten Doppelbindungen des Porphyrinringes und der Doppelbindungen der Seitenketten die Lage der Soret-Bande verschiebt. Holden vertritt die Ansicht, daß eine Abnahme der Höhe der Soret-Bande eine Öffnung des Porphyrinringes anzeigt. Um die spektralen Veränderungen im Bereich der Soret-Banden zu prüfen, wurden die bisherigen Versuche unter Einhaltung der gleichen Bedingungen wiederholt. Dabei wurde nicht der zeitliche Verlauf der Reaktion an einer bestimmten Stelle des Spektrums verfolgt, sondern nach 30 min, wenn die Reaktion praktisch abgeschlossen war, die spektralen Veränderungen im Gebiet der Wellenlängen von 400—430 mμ bestimmt. Infolge der hohen spezifischen Extinktion der Soret-Bande war es notwendig, um im Meßbereich des Spektralphotometers zu bleiben, die Lösungen zur Messung 25mal zu verdünnen. Außerdem ergab sich bei diesen Untersuchungen, daß die bei der Messung einfallende langwellige UV-Strahlung eine weitere chemische Umwandlung des Hb-Moleküls, verbunden mit einer raschen Extinktionsabnahme, bewirkte. Es wurde darum notwendig, jede Einzelmessung mit einer neuen Küvettenfüllung so rasch als möglich durchzuführen.

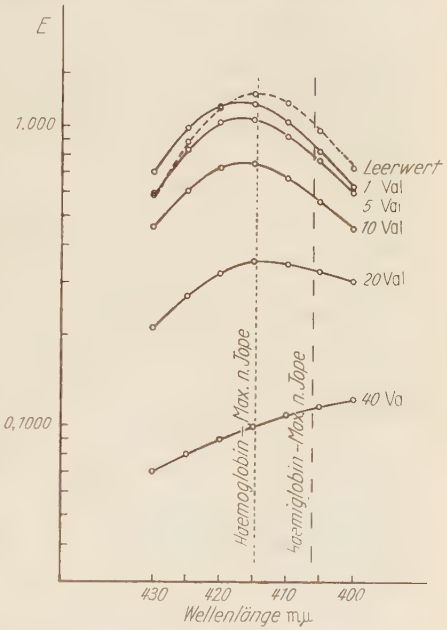


Abb. 6. Veränderung der Soret-Bande unter Hypochlorit-Einwirkung. Blutfarbstoff-Endkonzentration = $2{,}4 \cdot 10^{-7}$ Val/cm³. Abszisse: Wellenlänge in mμ. Ordinate: Extinktion

Das Ergebnis der Versuche ist in Abb. 6 graphisch dargestellt. Unter Leerwert ist das Spektrum der Oxyhämoglobinlösung ohne Einwirkung von Hypochlorit zu verstehen. Die Abbildung zeigt, daß bereits eine geringe Hypochloritkonzentration zu einer deutlichen Abnahme der Höhe der Soret-Bande führt. Höhere Konzentrationen verursachen eine weitere

Abnahme, so daß bei 40 Val Hypochlorit in diesem Spektralbereich kein Maximum mehr zu erkennen ist. Es war zu erwarten, daß infolge von Hämiglobinbildung eine Verschiebung der Soret-Bande in Richtung des kurzwelligen UV auftreten würde. Die Untersuchungen ergaben jedoch die auffällige Tatsache einer Wanderung der Bande in Richtung auf den sichtbaren Bereich.

Diskussion

Die beschriebenen Versuche haben gezeigt, daß Hypochlorit in der Lage ist, Hämiglobin zu bilden in einer Reaktion, welche ihre maximale Geschwindigkeit zu Beginn besitzt. Dies bedeutet, daß das Hypochlorit selbst (im Gegensatz zum Chlorit und Chlorat) fähig ist, mit dem Eisenatom des Hämoglobin-Moleküls in Reaktion zu treten. Dabei ist derjenige Anteil des insgesamt einwirkenden Hypochlorits, der die Bildung des Hämiglobins bewirkt, um so größer, in je geringerer Konzentration das Hypochlorit mit dem Blutfarbstoff zur Reaktion kommt. Eine Extrapolation auf eine stöchiometrisch quantitative Umsetzung bei hinreichend geringer Konzentration scheint jedoch auf Grund dieser Werte nicht erlaubt zu sein, da selbst bei dem niedrigsten der hier geprüften Konzentrationsverhältnisse die Hauptmenge des Oxydationsmittels nicht mit dem Eisen, sondern mit anderen Gruppen des Hb-Moleküls reagiert.

Durch die Bestimmung des während der Reaktion noch vorhandenen Hypochlorits wurde der Nachweis erbracht, daß der wesentliche Abschnitt der Reaktion, welcher bereits nach 5 min beendet ist, unter Verbrauch eines großen Anteiles der Oxydationsäquivalente des Hypochlorits abläuft. Nach einer Reaktionszeit von 60 min sind allerdings noch etwa 10% des eingesetzten Hypochlorits nachweisbar, und es besteht daher die Möglichkeit, daß die Reaktion bei einem Gleichgewicht zum Stillstand kommt. Dieses müßte weit auf der Seite der Reduktion des Hypochlorits liegen. Es ist jedoch wahrscheinlicher, daß sich die Reaktion mit der Abnahme der Konzentration der einzelnen Partner stark verlangsamt, nach 60 min noch nicht beendet ist und mit geringer Geschwindigkeit einem Entwert zustrebt. Infolge der gleichzeitig ablaufenden Spontanoxydation, deren Ausmaß gegen Ende der Hypochlorit-Reaktion schwierig zu beurteilen ist, läßt sich diese Frage zu nächst nicht definitiv beanworten.

Aus dem Ergebnis der Messungen bei den Wellenlängen 566, 630 und 850 mμ geht eindeutig hervor, daß neben dem Hämiglobin mindestens noch eine, wenn nicht noch mehrere gefärbte Substanzen entstehen. Diese besitzen gewisse chemische Eigenschaften gemeinsam mit dem Hämiglobin, da sie bei Zusatz von Kaliumcyanid spektralphotometrisch ein qualitativ gleiches, wenn auch quantitativ verschiedenes Verhalten zeigen. Die Verschiebung der Soret-Bande in Richtung auf den langwelligen Spektralbereich spricht sogar dafür, daß die Bildung von

Hämiglobin gegenüber der Bildung dieser anderen Stoffe zurücktritt. Es könnte sich um Verdo- und Verdiglobine handeln gleich oder ähnlich den von KIESE beschriebenen Verbindungen, welche ebenfalls Hb^{III} gegenüber eine Verschiebung der Soret-Bande in den langwelligen Bereich, sowie eine verminderte spezifische Extinktion, jedoch keine Änderung ihres spektralen Verhaltens bei Zugabe von Cyanid zeigen.

Bei der Verdünnung von Blutfarbstoff-Lösungen ist stets eine Zunahme der Spontanoxydation zu beobachten. Jedoch müßte auch bei vermehrter Spontanoxydation nach Abzug der durch sie gebildeten Hämiglobin-Menge die der jeweils gleichzeitig einwirkenden Hypochloritkonzentration entsprechende Umwandlung des Hämoglobins zu erkennen sein. Von den sich anbietenden Deutungen für das scheinbare Überwiegen der Spontan-Oxydation über die Hypochlorit-Oxydation besitzt diejenige die größte Wahrscheinlichkeit, die davon ausgeht, daß die Spontan-Oxydation schon infolge Einwirkung geringer Hypochloritmengen in ihrem Ablauf gestört wird. Somit wäre es grundsätzlich nicht zulässig, die im Parallelversuch bestimmten Werte der Spontan-Oxytion von den durch das Hypochlorit bedingten abzusetzen.

Diese Ansicht wird gestützt durch die Beobachtung, daß es nach weitgehender Reduktion des Hypochlorits nur noch zu einer sehr geringen Zunahme des Hämiglobins kommt, die durch Spontan-Oxydation hervorgerufen sein kann. Diese Verminderung der Spontan-Oxydation ist sicher nicht durch die Abnahme des reaktionsfähigen Hämoglobins bedingt, denn nach der Einwirkung der niederen Hypochloritkonzentrationen liegen noch annähernd 75% des Blutfarbstoffs als Oxy-Hämoglobin vor. LEMBERG u. LEGGE diskutieren die Ansichten verschiedener Autoren, daß zur Spontan-Oxydation des Hämoglobins die Einwirkung von Reduktionsäquivalenten neben Sauerstoff notwendig ist. Der Wasserstoff-Donator wird im Eiweißanteil des Moleküls vermutet. Durch Hypochlorit und ähnlich reagierende Stoffe könnte nun dieser Wasserstoff-Donator oxydiert und damit die Spontan-Oxydation zum Erliegen gebracht werden. Es ergibt sich daher mit gewisser Wahrscheinlichkeit, daß die Spontan-Oxydation nur normal verläuft, wenn das Hämoglobin oder auch ein in der Lösung vorhandener, noch unbekannter Katalysator, wie er von EGGLETON u. FEGLER postuliert wird, völlig unverändert sind.

Es hat sich gezeigt, daß die Hämiglobinbildung durch optimale Hypochlorit-Konzentrationen bis zu 5 Val auf 1 Val Hb^{II} ein Maximum von etwa 20% des gesamten Blutfarbstoffs nicht übersteigt. Höhere Oxydationsmittel-Konzentrationen bilden weniger Hb^{III} und verändern den Blutfarbstoff zunehmend noch an anderen Stellen neben dem Eisen. Diese Ergebnisse scheinen gewisse Anhaltspunkte für die Ergründung der Vorgänge bei der Chlorat-Oxydation zu bieten. Die Befunde lassen sich deuten, wenn man annimmt, daß die Oxydationen am Fe und an den anderen Stellen des Moleküls nicht unabhängig voneinander verlaufen, sondern daß erst nach Umwandlung von Hb^{II} in Hb^{III} das Gesamt-Molekül für das Oxydationsmittel leicht angreifbar wird. Wenn nun bereits das äußerst reaktionsfähige Hypochlorit vornehmlich mit Hb^{III}

reagiert, dann ist naheliegend, daß die viel weniger reaktionsfreudigen Chlorit- und Chlorat-Ionen das Hämoglobin-Molekül überhaupt nur dann angreifen, wenn das Eisen in 3wertiger Form vorliegt. Bei einer solchen Reaktion würde dann das Chlor dieser Ionen zur Hypochlorit-Stufe reduziert und wäre dann in der Lage, neben anderen Reaktionen Hb^{II} in Hb^{III} zu überführen. Auf diese Weise entstünde ein autokatalytischer Reaktionsverlauf mit Hämiglobin als Katalysator.

Diese Folgerungen gingen von Voraussetzungen aus, die bis jetzt noch nicht ausreichend experimentell gesichert sind und bilden daher zunächst nur eine Hypothese. Zwar konnte in früheren Versuchen bereits eine direkte Reaktion von Chlorit mit Hb^{III} beobachtet werden; der Nachweis einer solchen Reaktion mit dem Chlorat-Ion steht aber noch aus.

Zusammenfassung

Die Hämiglobinbildung durch Hypochlorit wurde in dem Konzentrationsbereich von 1—40 Val Hypochlorit auf 1 Val Hb, bei einer Hb-Gesamtkonzentration von $2{,}4 \cdot 10^{-7}$ Val/cm³ beobachtet.

Die Reaktion besitzt ihre höchste Geschwindigkeit am Anfang und ist nach 30—45 min praktisch beendet.

Die maximale Hb^{III}-Bildung erfolgt durch 5 Val ClOH auf 1 Val Hb. Höhere und niedere ClO-Konzentrationen bilden weniger Hb^{III}.

Ein Teil des Blutfarbstoffs wird während der Reaktion so weit verändert, daß er mit der benutzten Meßmethode nicht mehr erfaßt wird. Diese Zerstörung ist direkt von der Konzentration des ClOH abhängig.

Durch gleichzeitige spektralphotometrische Messung bei 3 verschiedenen Wellenlängen des sichtbaren Bereiches und an der Soret-Bande wird nachgewiesen, daß ein Teil der als Hämiglobin erscheinenden Oxydationsprodukte veränderte Farbeigenschaften gegenüber dem Hämiglobin besitzt. Diese Substanzen entstehen wahrscheinlich durch oxydative Umwandlungen am Porphyrinring und sind den Verdoglobinen zuzurechnen.

Die Beobachtung der gleichen Reaktionen bei geringerer Hb-Endkonzentration ergab, daß nach ClOH-Einwirkung am noch verbliebenen Hb^{II} keine normale Spontanoxydation mehr abläuft.

Es wird versucht, von den mit Hypochlorit erhaltenen Ergebnissen aus auf Vorgänge bei der Chloratwirkung zu schließen.

Literatur

Eggleton, Ph., and G. Fegler: The oxydation of oxyhaemoglobin from different animal species. Quart. J. Exper. Physiol. **37**, 85 (1952). — Reduced glutathione and spontanous methaemoglobin formation in haemolysates. Quart. J. Exper. Physiol. **37**, 163 (1952); zit. n. Lemberg, R., u. J. W. Legge. — Havemann, R., F. Jung u. B. v. Issekutz: Die Bestimmung von Methämoglobin im Blute mit dem lichtelektrischen Kolorimeter. Biochem. Z. **301**, 116 (1939). — Heubner, W., u. F. Jung: Zur Theorie der Chloratvergiftung. Schweiz. med.

Wschr. **1941**, 27. — Über eine Katalyse durch Methämoglobin (Hämiglobin). Ber. dtsch. chem. Ges. **75**, 1636 (1942). — Holden, H. F.: zit. nach Lemberg, R., u. J. W. Legge (S. 227). — Jope, E. M.: The Ultraviolet Spectral Absorption of Haemoglobins Inside and Outside the Red Bload Cell. Haemoglobin Symposion in Memory of Sir J. Barcroft. S. 205. London: Publ. Butterworth Sci. 1949. — Kiese, M.: Darstellung und Eigenschaften von Verdoglobin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 385 (1946). — Koransky, W.: a) Beitrag zur Theorie der Chloratoxydation. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 483 (1952). — Koransky, W.: b) Inaug. Dissertation. Freie Universität. Berlin: 1952. — Lemberg, R., and J. W. Legge: Hematin compounds and bile pigments. S. 392 Publ. London: Intersci. 1949. — Marshall, J., and W. H. Welker: The precipitation of colloids by means of aluminium hydroxyde. J. Am. Chem. Soc. **35**, 820 (1913). — Meyer-Wilmes, J., u. H. Remmer: Die Standardisierung des roten Blutfarbstoffes durch Hämiglobincyanid. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 441 (1956). — Van Slyke, D. D., u. A. Hiller: Determination of Ammonia in Blood. J. biol. Chem. **102**, 499 (1933).

Dr. W. Koransky, Pharmakologisches Institut der Freien Universität, Berlin-Dahlem, Thielallee 69—73

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 432—434 (1957)

Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Thessaloniki
(Direktor: Prof. Dr. N. Klissiunis)

Verzögerung des Eintritts der Strophanthinwirkung durch Polyvinylpyrrolidon

Von
N. Klissiunis

(Eingegangen am 29. Januar 1957)

Es ist bekannt, daß Polyvinylpyrrolidon (PVP) sowohl wegen seiner Eignung als Plasmaersatzflüssigkeit als auch wegen seiner Vehikelfunktion (Schubert) und seiner entgiftenden Eigenschaften angewandt wird. Aus Angaben der Literatur geht hervor, daß PVP die Wirkung vieler Arzneimittel verlängert. Dies gilt für Insulin (Loubatières), östrogene Stoffe (Lavedan), Chinin (Quevauviller), Vasopressin (Antonson u. Krøigaard) usw. Für einige Mittel, wie z. B. die Barbitursäurederivate und Analgetica [Graham, Slinger, Teed (1, 2)], widersprechen sich die Angaben für die Wirkungsverlängerung. Für andere Mittel wie Heparin (Cuny, Quivy) wird eine Wirkung des PVP nicht angenommen. Für verschiedene Substanzen (Higuchi, Kuramoto 1, 2, 3) wurde in vitro eine Komplexbildung mit PVP beobachtet.

Methodik

g-Strophanthin wurde in den vorderen Lymphsack von 20—60 g schweren Fröschen (meistens R. Temporaria) injiziert. Es wurde zuerst eine 0,036%ige Strophanthinlösung und PVP in der Weise vermischt, daß die Endkonzentration von PVP 20%ig oder 40%ig war. Aus dieser Mischung wurden dann mit der entsprechenden PVP-Lösung Verdünnungen hergestellt. Die in 1 cm^3 der Verdünnungen enthaltenen Strophanthinmengen verhielten sich zueinander wie eine geometrische Reihe mit dem Quotient 1,22. Auf diese Weise erhielten die Frösche verschiedene Strophanthinmengen in mg/kg in demselben Volumen, 14 cm^3/kg Froschgewicht. Die Kontrollen erhielten dieselben Strophanthinmengen in 0,9%iger NaCl-Lösung. Es wurden 2 Sorten von PVP[1] geprüft, eine mit dem Mol-Gew. 30000 ($K = 26$) und eine andere mit dem Mol-Gew. 50000. Die Frösche wurden 24 und 48 Std nach Versuchsbeginn beobachtet. Jeweils 15 min nach der Injektion haben wir den Umkehrreflex geprüft und die Zeit bestimmt, ab wann der Frosch sich aus der Rückenlage nicht mehr umdrehen konnte. In dieser Weise hatten wir ein Maß der resorptionsverlangsamenden Wirkung des PVP: Die Zeitintervalle, nach denen sich sowohl die Kontrollen als die PVP-injizierten Frösche aus der Rückenlage nicht mehr umdrehten, wurden entsprechend jeder einzelnen Dosis addiert. Aus der Summe wurde das arithmetische Mittel bestimmt. Bei Anwendung des t-Testes konnten wir dann die signifikante

[1] Für die Überlassung von PVP-Substanz sind wir der Firma Bayer, Leverkusen, sehr zu Dank verpflichtet.

Differenz bestimmen. Es wurde immer an demselben Tage (meistens im Herbst und Winter) eine Reihe Frösche mit Strophanthin allein und 2 andere Reihen mit je 20 und 40% PVP + Strophanthin behandelt. Die Zahl der überlebenden Tiere wurde nach 48 Std registriert. Auf Grund dieser Zahlen wurde nach der Methode von Litchfield u. Willcoxon die LD 50 bestimmt.

Versuchsergebnisse

Für die Kontrolltiere betrug die LD 50 des Stophanthins 1,8 mg/kg. Der Fehlerfaktor war 1,08 und die Konfidenzintervalle 1,94—1,6 ($P = 0{,}05$). In den Versuchen mit PVP (M. G. 30000), 20%, betrug die LD 50 des Strophanthins 2 mg/kg. Der Fehlerfaktor war 1,15 und die

Tabelle 1. *Wirkung des PVP (Mol-Gew. 30000) auf den zeitlichen Eintritt der Lähmungswirkung des Strophanthins. Mittelwerte aus 5 Versuchen.* ± = *mittlere Abweichung des Mittelwertes. Gruppen von je 6 Versuchstieren* Die Zahlen bedeuten Minuten nach der Strophanthininjektion

	Strophanthin mg/kg					
PVP %	1,0	1,2	1,5	1,8	2,2	2,8
0	98[1] ± 20,6	121 ± 21,8	105[1] ± 24	88 ± 8	107[1] ± 7,8	52[1] ± 3
20	150[2] ± 9,6	175 ± 15,4	191 ± 31,3	151 ± 7,8	255 ± 3,7	99 ± 10
40	166[2] ± 3,8	214[2] ± 20,9	188[1] ± 19,8	130 ± 19,3	136[2] ± 13,3	144 ± 21,6

[1] 1 Tier nicht gelähmt.
[2] 2 Tiere nicht gelähmt.

Konfidenzintervalle 2,3—1,7. In den Versuchen mit PVP (M. G. 50000), 20%, betrug die LD 50 1,65 mg/kg. Der Fehlerfaktor war 1,16 mit Konfidenzintervallen 1,91—1,41. Es wurden insgesamt 500 Frösche gebraucht. Aus diesen Werten geht hervor, daß eine signifikante Differenz zwischen der LD 50 der Kontrollen und der PVP-Tiere nicht besteht. PVP also die toxische Wirkung des Strophanthins nicht beeinflußt. Vergleicht man aber die Zeiten, die bis zur Lähmung vergehen, dann ergibt sich, daß im allgemeinen die mit PVP-Zugabe injizierten Frösche später gelähmt werden als die mit Strophanthin allein injizierten Frösche (vgl. Tabelle). Die lähmende Strophanthinwirkung ist bei einer Dosis auch von 0,8—1 mg/kg nicht bei allen Tieren deutlich. Dies gilt besonders für die mit PVP behandelten Frösche. Bei der Dosierung von 1,2—2,8 mg/kg tritt bei den mit PVP behandelten Fröschen die Lähmung später auf als bei den Kontrollen. Die Anwendung des *t*-Testes zeigte, daß, signifikative Unterschiede bestehen (P 0,01—0,05). Die Resultate wurden zusätzlich mit Hilfe der Varianzanalyse ausgewertet. Diese zeigte, daß, unabhängig von den Dosen zwischen Strophanthin allein und PVP + Strophanthin signifikante Differenzen bestehen, so daß die Annahme berechtigt erscheint, daß Strophanthin allein in einer anderen Weise wirkt als PVP + Strophanthin.

Zusammenfassung

In Versuchen an Fröschen wurde der zeitliche Eintritt der Wirkung lähmender Strophanthindosen durch Zusatz 20 und 40%iger Polyvinylpyrrolidonlösung verzögert.

An dieser Stelle möchte ich Frau Kallergi meinen Dank für ihre Ratschläge bei der statistischen Berechnung aussprechen.

Literatur

Antonsen, S., u. A. Krøigaard: Acta endocrinol (Copenh.) **12**, 371 (1953); ref. ch. abstr. **47**, 7664 (1953). — Cuny, L., et D. Quivy: C. r. Soc. Biol. (Paris) **142**, 1399 (1948). — Graham, W. D., R. Slinger and H. Teed: J. Pharm. a. Pharmacol. (1) **6**, 27 (1954); (2) **6**, 115 (1954). — Higuchi, T., and R. Kuramoto: (1) J. Amer. Med. Assoc. **43**, 393 (1954); (2) **43**, 398 (1954); (3) **45**, 659 (1956). — Lavedan, J. P.: C. r. Soc. Biol. **142**, 1481 (1948). — Litchfield, J. T., and F. Willcoxon: J. Pharmacol. Exper. Ther. **96**, 99 (1949). — Loubatieres, A.: Ann. endocr. Paris **7**, 173 (1946): ref. ch. abstr. **43**, 1863 (1949). — Quevauviller, A.: Ann. pharmac. franç. **5**, 93 (1947); ref. ch. abstr. **42**, 286 (1948). — Schubert, R.: Z. klin. Med. **145**, 608 (1949).

Prof. Dr. N. Klissiunis, Pharmakolog. Institut der Universität Leof. Olgas 11 Thessaloniki/Griechenland

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 435—447 (1957)

Aus der III. Inneren Abteilung des städtischen István-Krankenhauses (Vorstand: Privatdozent Dr. G. Gottsegen) und dem Pathologischen Institute des Korányi-Krankenhauses (Vorstand: Dr. M. Csornay) in Budapest

Wirkung synthetischer Hibernatoren auf das experimentelle Lungenödem

Von

G. Gottsegen, I. Szám und M. Csornay

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Januar 1957)

Die nachfolgenden Untersuchungen hatten die Prüfung der von Laborit in die Therapie eingeführten „lytischen Mischung" (M_1), ihrer einzelnen Bestandteile — Chlorpromazin (Largactil, Megaphen), Promethazin (Phenergan, Atosil) und Dolantin — sowie einiger Substanzen mit vermeintlich ähnlichen Angriffspunkten hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Lungenödem zum Zwecke. Ihr Ausgangspunkt lag in der Erkenntnis, daß zahlreiche Effekte dieser „neuroplegischen" Medikation den für die Entstehung des akuten Lungenödems in erster Linie verantwortlichen Faktoren — Überlastung des kleinen Kreislaufes und erhöhte Durchlässigkeit der Capillaren — sowie den pathogenetisch oft übergeordneten Störungen des Zentralnervensystems wirksam entgegentreten können.

Die Annahme wurde bereits durch vereinzelte klinische Beobachtungen — von Decortis, Cahn, Mullon bezüglich der lytischen Mischung, Umdenstock, Voegtlin, Millon u. Mitarb. bezüglich Chlorpromazin und Tremonti bezüglich Promethazin — unterstützt, die allerdings nicht unwidersprochen blieben (Aubertin, Véghelyi u. Mitarb.). Was die experimentelle Forschung anbelangt, haben wir keine Angaben über die Wirkung der M_1 in dem uns zugänglichen Schrifttum gefunden, über die einzelnen Phenothiazinderivate sind hingegen verschiedene, zum Teil widersprechende Mitteilungen — je nach der studierten Ödemform und angewendeten Tierart (Di Mattei) gemacht worden. So hat man mit Chlorpromazin positive Ergebnisse bei den durch reine Sauerstoffatmosphäre — unter normalem Druck — (Grandpierre u. Grognot; Grognot u. Chomé), sowie durch Adrenalin (Fischetti; Danese u. De Cesare) ausgelösten Lungenödemen erzielt, bei dem Chlorpikrinödem erwies es sich als völlig unwirksam (Courvoisier u. Mitarb.; Di Mattei) und bei dem durch Barbiturate verursachten Lungenödem als von ausgesprochen ungünstigem Einfluß (Fischetti). Es herrscht auch über die Wirkung des Promethazin beim Adrenalinödem keine Übereinstimmung: Di Mattei; Halpern u. Mitarb.; Poulsen haben über allseitige Schutzwirkung berichtet, während Stone u. Loew nur eine Herabsetzung der Letalität bei unveränderter Ödementwicklung feststellten. In Gegensatz zu den Angaben über Unterdrückung bzw. Hemmung des durch Chlorpikrin, Phosgen (Halpern u. Mitarb.), CO_2 (Poulsen) sowie intracysternäre Fibrineinspritzung (Cruchaud u. Vermeil) bewirkten Lungenödems bezeichnet Winter das Promethazin als völlig unwirksam.

Untersuchungen mit einheitlicher Versuchsanordnung schienen daher geboten. Wir haben die Beeinflussung des durch Ammonchlorid, sowie durch reinen Sauerstoff unter hohem Drucke ausgelösten Lungenödems zum Gegenstand unserer Studien gewählt; da bei der Entstehung des ersten Kreislaufstörungen (Gottsegen, Szám u. Csornay, 1954), bei der des zweiten lokale Gewebsschädigungen (Dieselben, 1956) die führende Rolle spielen, erschien uns diese Zusammenstellung als geeignet, um bezüglich des Wirkungsmechanismus aufschlußreiche und auf die vielgestaltige menschliche Pathologie — wenn auch mit größter Vorsicht — übertragbare Resultate zu liefern.

Methodisches

Die Versuche wurden an weißen Ratten von 150—200 g Körpergewicht ausgeführt. Die Ammonchloridvergiftung ist durch intraperitoneale Einspritzung von 0,7 ml/100 g Körpergewicht einer 6%igen Lösung, das hyperoxische Lungenödem durch 3stündige ununterbrochene Unterbringung in einer Sauerstoffkammer von 3,5 Atm. Überdruck ausgelöst. In einzelnen Versuchsreihen erwies sich nach den Vorversuchen eine kürzere bzw. diskontinuierliche Exposition als vorteilhaft; diesbezügliche Angaben werden an Ort und Stelle angeführt. Jede Serie bestand aus derselben Anzahl von simultan in Versuch genommenen vorbehandelten und Kontrolltieren gleichen Alters und Gewichtes. Letztere wurden nur der das Lungenödem hervorrufenden Einwirkung ausgesetzt, erstere erhielten außerdem die zu prüfenden Agentien in den weiter unten angegebenen Zeitpunkten und Mengen.

Unmittelbar nach spontanem Ableben, oder Aufopferung (durch konzentrierte Ätherdämpfe) der Tiere wurde das Körpergewicht bestimmt, die Obduktion vorgenommen, die Lungen abgewogen und samt Herz und Gehirn in Formol fixiert zwecks histologischer Verarbeitung. Die Auswertung der mikroskopischen Befunde erfolgte „blind", d. h. ohne Kenntnis der experimentellen Daten. Mit (+++) sind auf die Gänze der Lungen, mit (++) auf einzelne Lappen erstreckende, mit (+) herdweise zerstreute Veränderungen bezeichnet worden. Die Schwere des Ödems wurde in den einzelnen Serien durch Vergleich einerseits der histologischen Befunde, andererseits der Mittelwerte (samt mittleren Fehlern) der Lungen-Körpergewichtsindices (Lungengew. × 100/Körpergewicht) zwischen vorbehandelten und Kontrolltieren beurteilt. Jede der beiden Methoden hat ihre Fehlerquellen: bei Durchsicht selbst zahlreicher Schnitte dürften bestehende Veränderungen in einzelnen Fällen über- oder unterwertet werden, das relative Lungengewicht wird hingegen durch verschiedene Faktoren — Körpergröße (Poulsen), Blutreichtum — außer dem Ödem beeinflußt. Nur ihre gemeinsame Anwendung und gegenseitige Kontrolle sichert zuverlässige Wertung.

Elektrokardiographische Untersuchungen sind mittels eines Kathodenstrahloscillographen unter Anwendung von Nadelelektroden, in Bauchlage, an nicht festgebundenen Tieren vorgenommen worden. Bei fortlaufender Beobachtung am Leuchtschirm wurden alle 5 min — oder auch dazwischen, falls Veränderungen auftraten — Aufnahmen mit einer Filmgeschwindigkeit von 90 mm/sec verfertigt.

Versuchsergebnisse

1. Lytische Mischung. (Tab. 1). 10 Ratten der ersten Serie erhielten bloß Ammonchlorid, weiteren 10 wurden 45 min davor 1 ml/100 g Körpergewicht einer verdünnten Laboritschen Mischung — 0,025 g

Chlorpromazin, 0,05 g Promethazin, 0,1 g Dolantin, 22,5 g dest. Wasser — intraperitoneal injiziert. 9 Tiere der ersten Gruppe sind binnen 24—40 min verstorben; 5 zeigten hochgradiges und mittelstarkes Lungenödem bei der Autopsie, auch war das relative Lungengewicht — 1,82 ± 0,017 — für hochgradiges Ödem bezeichnend. Während nur ein einziges Kontrolltier die Vergiftung überstand, blieben sämtliche mit M_1 vorbehandelte Tiere am Leben; so sind ihre Lungen nicht untersucht worden. In der nächsten Serie haben wir Versuchspaare eingestellt und das vorbehandelte Tier jedesmal aufgeopfert, sobald seine Kontrolle einging. Von den 10 Kontrollen ist wieder eins am Leben geblieben; zwei vorbehandelte Ratten sind bereits nach Einspritzung der Mixtur, vor der Salmiakverabreichung, verendet. Keines der restlichen 7 ist spontan eingegangen; die histologische Untersuchung ihrer Lungen hat — im Gegensatz zu den Kontrollen — nur ein geringfügiges Ödem ergeben, auch war ihr Gewichtsindex wesentlich niedriger. Die lytische Mischung hat demnach nicht nur die Letalität des Ammonchlorid aufgehoben, sondern auch die Entwicklung des Lungenödems gehemmt.

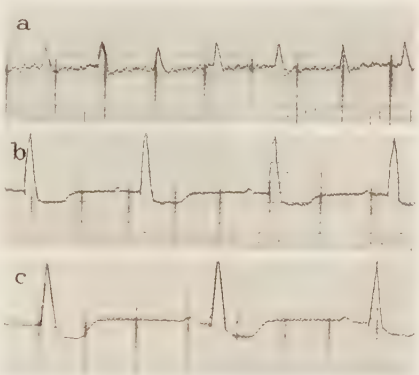


Abb. 1. Ratte Nr. 1. Auftreten von Krämpfen, Bradykardie und Senkung des Zwischenstückes 15 min nach Injektion von Ammonchlorid. Exitus nach 40 min. Sektionsbefund: Hochgradiges Lungenödem. Elektrokardiogramme (Abl. I.) a) vor, b) 15 min, c) 37 min nach Inj. Zeitmarkierung: 0,02 —0,1 sec

Die Beeinflussung des O_2-Lungenödems wurde an 13 in ähnlicher Weise vorbehandelten und 15 Kontrolltieren geprüft. Wie aus Tab. 1 ersichtlich, hat die Verabreichung von M_1 sowohl die Sterblichkeit reduziert, als auch der Ödementstehung entgegengewirkt laut histologischem Bilde und Gewichtsindex. Blutreichtum der Lungen, degenerative Veränderungen des Alveolarepithels, sowie perivasculäre Infiltrationen waren bei den unbehandelten Kontrollen ebenfalls bedeutend stärker ausgebildet. Die zuungunsten letzterer nachweisbaren Abweichungen sind um so höher zu werten, da in dieser Versuchsreihe nur die spontan verstorbenen Tiere verarbeitet wurden; hätten wir die Überlebenden ebenfalls aufgeopfert, so wäre mit einer größeren Anzahl ödemfreier Lungen und einem niedrigeren Quotienten unter den vorbehandelten Tieren zu rechnen gewesen.

Es wurde im folgenden der Frage nach dem Zusammenhange des Schutzeffektes der Mixtur mit der Herabsetzung der Körpertemperatur nachgegangen. Diese Hibernationwirkung im engeren Sinne war ja auch

in unseren Versuchen feststellbar; während die Rectaltemperatur der Kontrolltiere durchschnittlich um 2,1° C im Laufe des Versuches (von 36,3° auf 34,2°) fiel, sank sie um 7° (von 36,6° auf 29,6°) bei den vorbehandelten Ratten. Sodann wurden 4 Ratten mit derselben Anzahl von Kontrollen unmittelbar nach Einspritzung der M_1 in einen Thermostat von 37° C gesetzt und während der ganzen Versuchsdauer dort gehalten. Zur Zeit der Ammonchloridinjektion war ihre Körperwärme mäßig übernormal — durchschnittlich 37,5° C — und ist während des Versuches noch leicht — 0,9° C bei den vorbehandelten, 0,8° C bei den Kontrolltieren — angestiegen. Trotz Ausfall des Kühleffektes überlebten 3 von

Tabelle 1.

Einfluß der lytischen Mischung auf das experimentelle Lungenödem der Ratte

	Ammonchlorid-Vergiftung		Sauerstoff-	
	Vorbehandelte	Kontrolltiere	Vorbehandelte	Kontrolltiere
Lungenödem (+++) .	—	8	—	9
Lungenödem (++) . .	1	8	1	4
Lungenödem (+) . . .	4	1	4	—
Ödemfrei	2	1	3	—
Überlebend	10	1	5	2
Rel. Lungengewicht . .	1,32 ± 0,111	1,70 ± 0,073	1,50 ± 0,165	1,77 ± 0,085

den 4 vorbehandelten Ratten die Vergiftung, während sämtliche Kontrolltiere mit mächtigem Lungenödem (rel. Lungengewicht: 1,98) verstarben. *Der Temperaturabfall ist demnach keine notwendige Voraussetzung des protektiven Effektes.*

Nachdem in früheren Untersuchungen (Gottsegen, Szám u. Csornay, 1954) dargetan wurde, daß das Salmiaködem regelmäßig mit hochgradiger Bradykardie und elektrokardiographischen Veränderungen — besonders seitens der Nachschwankung — einhergeht, haben wir 5 mit M_1 vorbehandelte Tiere während des ganzen Versuches diesbezüglich kontrolliert. Abb. 1 und 2 zeigen einige Herzstromkurven je eines vorbehandelten und Kontrolltieres. Die für die letzteren charakteristische Frequenzherabsetzung und sonstige elektrokardiographische Veränderungen waren in keiner der vorbehandelten Ratten nachweisbar.

2. Chlorpromazin (Tab. 2). Die angewandte Dosis von 0,01 g/kg Körpergewicht entsprach dem Chlorpromazingehalte unserer Mischung; sie wurde ebenfalls 45 min vor Beginn des Hauptversuches intraperitoneal injiziert. Von 19 vorbehandelten Ratten haben 8 die Ammonchloridvergiftung überstanden (5 von ihnen wurden nach 60 min getötet), 11 sind nach durchschnittlich 41,4 min eingegangen. Von 15 Kontrollen blieb kein einziges am Leben, 4 sind innert 15 min gestorben. Diese

wurden im weiteren nicht berücksichtigt, da die kurze Lebensdauer unseren früher mitgeteilten Erfahrungen nach nicht zur Entwicklung eines Lungenödems ausreicht. 11 Tiere verendeten 26—60, durchschnittlich 40,2 min nach Versuchsbeginn. Das relative Lungengewicht der vorbehandelten Ratten war deutlich niedriger. Ihre Lungen erwiesen sich

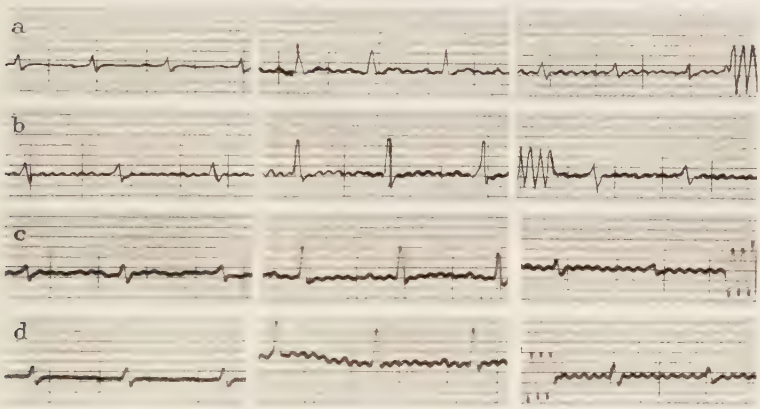


Abb. 2. Das mit lytischer Mixtur vorbehandelte Tier Nr. 342 hat die Ammonchloridvergiftung ohne Lungenödem überstanden. Die Herzfrequenz bleibt konstant, das Ekg. unverändert. Elektrokardiogramme (Abl. I—III): a) vor, b) 21 min. c) 30 min, d) 35 min nach Ammonchloridinjektion

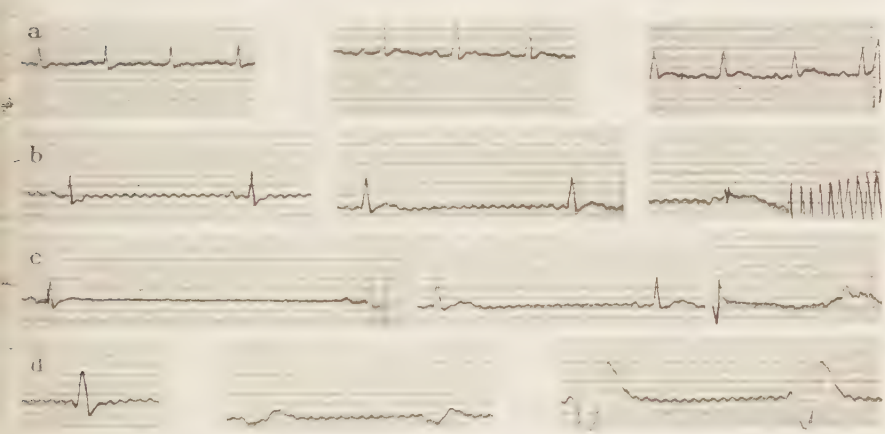


Abb. 3. Ratte Nr. 111. Auftreten schwerer Bradykardie, trotz Vorbehandlung mit Chlorpromazin. Die Deformierung der Kammerkomplexe unter d) gilt als terminale Erscheinung. Exitus nach 22 min. Sektionsbefund: kein Lungenödem

als ödemfrei in über der Hälfte der Gruppe, in Gegensatz zu den ausnahmslos mit Lungenödem wechselnder Schwere behafteten Kontrolltieren. Das Mittel übte also eine bemerkenswerte Schutzwirkung aus, deren Angriffspunkt jedenfalls extracirculatorisch gelegen sein dürfte, da die charakteristische Herabsetzung der Herzfrequenz — in Gegensatz zu

den mit der lytischen Mixtur gemachten Beobachtungen — sich bei vorbehandelten und Kontrolltieren in gleichem Ausmaße nachweisen ließ (Abb. 3).

8 Tiere sind nach identischer Vorbehandlung dem hohen Sauerstoffdrucke ausgesetzt worden gleichzeitig mit 8 Kontrollen. Von letzteren blieben nach 3stündiger Exposition zwei am Leben, ein weiteres verendete erst nach 1340 min. Sämtliche vorbehandelten Ratten sind — den restlichen Kontrollen gleich — innerhalb weniger Minuten nach Öffnung der Kammer eingegangen. Ihr Lungengewicht war ausgesprochen höher, als der unbehandelten; histologisch ließen sich jedoch keine nennenswerten Unterschiede — weder in bezug auf das Ödem, noch auf die

Tabelle 2. *Wirkung des Chlorpromazin auf das experimentelle Lungenödem*

	Ammonchlorid-Vergiftung		Sauerstoff-Vergiftung	
	Vorbehandelte	Kontrolltiere	Vorbehandelte	Kontrolltiere
Lungenödem (+++) .	1	2	6	5
Lungenödem (++) . .	2	4	2	—
Lungenödem (+) . . .	2	5	—	—
Ödemfrei	6	—	—	—
Überlebend	8	—	—	3
Rel. Lungengewicht . .	1,30 ± 0,068	1,57 ± 0,111	1,72 ± 0,098	1,49 ± 0,033

sonstige desquamativ-degenerative Veränderungen — nachweisen. Das hyperoxische Lungenödem wurde also durch Chlorpromazin nicht im geringsten abgewehrt.

In Anbetracht der Angaben von Courvoisier u. Mitarb., wonach das Mittel die Wirksamkeit des Procain zu potenzieren vermag, sowie eigener früherer Befunde über den protektiven Effekt des letzteren gegen Lungenödem, haben wir im weiteren geprüft, ob kleine, an sich unwirksame Procaindosen — 0,1 ml einer 1%igen Lösung — in Kombination mit Chlorpromazin die Entwicklung des Sauerstoffödems zu beeinträchtigen vermögen. Die Versuche haben durchweg negative Resultate gezeitigt.

3. Promethazin (Tab. 3). 14 Tieren wurde 15 min vor der Salmiakinjektion 0,0235 g/kg Körpergewicht intraperitoneal eingeführt, 15 dienten zur Kontrolle. Eine Ratte der ersten Gruppe ist bereits nach 8 min eingegangen, eine andere hat die Vergiftung überstanden, 11 starben an ihren Folgen in durchschnittlich 22,8 min. 2 Kontrollen verendeten nach 9 bzw. 10 min, die mittlere Lebensdauer der übrigen betrug durchschnittlich 37,3 min. Das relative Lungengewicht der vorbehandelten Tiere übertraf das der Kontrollen, die histologische Untersuchung förderte hingegen keine nennenswerten Unterschiede zwischen beiden Gruppen zutage.

16 vorbehandelte und 15 Kontrolltiere wurden gleichzeitig hohen Sauerstoffdrucken ausgesetzt; da die ersten Versuche auf eine besonders hochgradige Empfindlichkeit unserer derzeit zur Verfügung stehenden Ratten hinwiesen, mußte die Exposition auf 2 Std reduziert werden. 3 bis 4 Tiere haben den Eingriff überlebt, die übrigens ind während, oder in der ersten halben Stunde nach der Exposition verstorben. Das relative Lungengewicht war bei der Kontrollgruppe ausnehmend hoch, bei den

Tabelle 3. *Wirkung des Promethazin auf das experimentelle Lungenödem*

	Ammonchlorid-Vergiftung		Sauerstoff-Vergiftung	
	Vorbehandelte	Kontrolltiere	Vorbehandelte	Kontrolltiere
Lungenödem (+++) .	6	4	3	7
Lungenödem (++) . .	3	8	7	5
Lungenödem (+) . . .	1	1	3	—
Ödemfrei	2	0	—	—
Überlebend	1	—	3	3
Rel. Lungengewicht . .	1,68 ± 0,180	1,33 ± 0,064	1,79 ± 0,134	2,19 ± 0,187

Versuchstieren wesentlich niedriger, doch immer noch in der für schwerstes Lungenödem charakteristischen Größenordnung. Der histologischen Beurteilung nach war das Ödem etwas höhergradig in der vorbehandelten Gruppe.

Das Mittel besitzt demnach mäßige Schutzwirkung gegen Sauerstoff-, sicher keine gegen das Ammoniumchloridödem.

4. Dolantin (Tab. 4). 15 Tieren wurde 15 min vor der Salmiakverabreichung 0,0455 g/kg Körpergewicht Dolantin intraperitoneal injiziert,

Tabelle 4. *Wirkung des Dolantin auf das experimentelle Lungenödem*

	Ammonchlorid-Vergiftung		Sauerstoff-Vergiftung	
	Vorbehandelte	Kontrolltiere	Vorbehandelte	Kontrolltiere
Lungenödem (+++) .	—	3	6	3
Lungenödem (++) . .	2	3	2	7
Lungenödem (+) . . .	3	3	2	—
Ödemfrei	4	—	—	—
Überlebend	—	—	—	—
Rel. Lungengewicht . .	1,26 ± 0,085	1,28 ± 0,018	1,95 ± 0,096	1,64 ± 0,088

10 dienten zur Kontrolle. Die vorbehandelten Ratten erwiesen sich als hinfälliger; 6 sind bereits innert 20 min eingegangen (gegen ein Kontrolltier), 9 Tiere haben durchschnittlich 29 min gelebt, während die mittlere Lebensdauer der Kontrolltiere 35 min betrug. Histologisch ließ sich ein

geringeres Ödem bei gleich starker Hyperaemie — der Lungen in der Versuchsgruppe nachweisen; doch waren die relativen Lungengewichte beider Gruppen völlig gleich (allerdings waren die Tiere ziemlich widerstandsfähig gegen Lungenödem; so wies auch die Kontrollgruppe einen weit niedrigeren Quotienten auf, als in den übrigen Serien). Das geringere Ödem der Versuchstiere dürfte allenfalls mit ihrer kürzeren Überlebenszeit im Zusammenhang stehen.

Der dreistündigen O_2-Exposition sind alle 10 Versuchs- und 10 Kontrolltiere erlegen. Das Ödem war — sowohl dem Lungengewichte, als auch der histologischen Beurteilung nach — in der Versuchsgruppe schwerer.

Dolantin hemmt also weder die Entwicklung des Salmiak- noch die des Sauerstoffödems in nachweisbarem Maße; letzterem scheint es gar Vorschub zu leisten.

5. Urethan (Tab. 5). Die mit der lytischen Mixtur und Chlorpromazin behandelten Tiere waren während der Versuchsdauer in oberflächlicher Narkose, aus der sie jederzeit mit Leichtigkeit geweckt werden

Tabelle 5. *Urethanwirkung auf das experimentelle Lungenödem*

	Ammonchlorid-Vergiftung		Sauerstoff-Vergiftung	
	Vorbehandelte	Kontrolltiere	Vorbehandelte	Kontrolltiere
Lungenödem (+++) .	7	7	2	7
Lungenödem (++) . .	2	2	4	2
Lungenödem (+) . . .	—	—	2	—
Ödemfrei	—	—	1	—
Überlebend	—	2	7	3
Rel. Lungengewicht . .	1,87 ± 0,063	1,70 ± 0,17	1,64 ± 0,262	1,96 ± 0,127

konnten. Es war daher zu prüfen, ob ähnliche protektive Wirkungen durch irgend ein anderes parenteral eingeführtes Narcoticum erzielt werden könnten. Die Wahl fiel auf Urethan, das in Dosen von 0,8 g/kg Körpergewicht in 10%iger Lösung intraperitoneal injiziert wurde und eine etwas größere Schlaftiefe bewirkte. 10 Tieren wurde es 15 min vor der Ammonchloridinjektion einverleibt, 11 dienten zur Kontrolle. Von letzteren haben zwei die Vergiftung überstanden, die übrigen sind ihr in durchschnittlich 40 min, die vorbehandelten in durchschnittlich 44 min erlegen. Die mikroskopische Untersuchung deckte hochgradiges Lungenödem in der Mehrheit beider Gruppen auf, dementsprechend auch der Gewichtsindex etwa gleich hoch war. Das Mittel hat die Entwicklung des Lungenödems in keiner Weise beeinflußt.

Die Wirkung auf das Sauerstoffödem wurde an 16 vorbehandelten und 12 Kontrolltieren untersucht. Aus der ersten Gruppe haben 7, aus der zweiten 3 Ratten die Intoxikation überlebt. Histologisch erwies sich das

Ödem als bedeutend ausgedehnter in der Kontrollgruppe; auch war deren rel. Lungengewicht höher, wenn auch der Unterschied infolge der ungewöhnlich großen Streuung innerhalb der Versuchsgruppe keine Signifikanz besitzt. Infiltration und Degeneration der bronchopulmonalen Gewebe war etwa gleich stark in beiden Gruppen. Werden jedoch sämtliche Befunde in Betracht gezogen, so ist an einem protektiven Effekte, der sich in erster Linie gegen die Letalität, doch auch gegen die Entstehung von Lungenödem richtet — nicht zu zweifeln.

6. Lobelin (Tab. 6). Chlorpromazin fördert die Atmung (Kleinsorge, Bücherl u. Ressel): bei herabgesetzter Frequenz steigert sie beträchtlich die Ventilationsvolumina. Dieser Effekt durfte den Vorgang der Ödembildung in der Lunge — durch Beschleunigung des Lymphabflusses, Vergrößerung der intrathorakalen Durchschwankungen — nicht unbeträchtlich beeinflussen; es sollte daher die Wirkung eines par excellence atmungsanregenden Mittels, wie Lobelin, zum Vergleich geprüft werden, um so eher, als es Halmágyi u. Mitarb. gelang, mit dessen großen Dosen verschiedenste Ödemformen zu kupieren. Bei der Ammonchloridvergiftung konnte es nicht geprüft werden, da die beiden Mitteln gemeinsame krampferregende Wirkung dem Leben der Tiere ein zu frühes Ende bereitete: dies kann durch Zugabe von Barbituraten abgewehrt werden, was aber die Verhältnisse unübersichtlich gestaltet. Wir haben daher unsere Untersuchungen auf das O_2-Lungenödem beschränkt: 8 Tieren wurde 1,5—2 Std nach Einführung in die Überdruckskammer 0,02 g/kg, alle 20 min danach weitere 0,015 g/kg Körpergew. Lobelin intraperitoneal injiziert. Die 3stündige Exposition wurde daher notwendigerweise diskontinuierlich, demzufolge 4 unter 10 Kontrollen, sowie 2 unter 8 vorbehandelten Tieren sie überstanden; die übrigen sind in der 3. und 4. Std nach Versuchsbeginn verstorben. Beide Gruppen erwiesen sich sowohl dem histologischen Bilde, als auch den Lungengewichten nach als gleichgeartet: eine protektive Wirkung des Mittels war nicht nachzuweisen.

Tabelle 6.
Wirkung des Lobelin auf das O_2-Lungenödem

	Sauerstoffvergiftung	
	Vorbehandelte	Kontrolltiere
Lungenödem (+++)	3	4
Lungenödem (++)	3	2
Lungenödem (+)	—	—
Ödemfrei	—	—
Überlebend	2	4
Rel. Lungengewicht	1,65 ± 0,124	1,59 ± 0,088

7. Sandosten-Calcium (Tab. 7). Die Phenothiazinderivate gehören der Wirksamkeit nach vor allen das Promethazin, doch auch Chlorpromazin (Nasmyth, Kopera) – in die Gruppe der Antihistaminsubstanzen, die im allgemeinen die Membrandurchlässigkeit herabzusetzen

vermögen (Friedberg). Dies gilt sowohl für M_1 — die nach Eichholtz unter allen bekannten Stoffen den stärksten permeabilitätshemmenden Effekt besitzt — als auch ihre obgenannten Ingredientien. Es war daher von Interesse, ein weiteres Antihistaminicum in den Kreis unserer Untersuchungen einzubeziehen; gewählt wurde das Sandosten-Calcium (Sandoz), da es neben hochgradigem Histaminantagonismus einen besonders ausgeprägten membrandichtenden und dem Procain etwa gleich starken lokalanästhetischen Effekt innehat und sich in der Bekämpfung des Chlorpikrin-Lungenödems des Meerschweinchens bereits bewährt hat (Rothlin u. Cerletti). Unseren Ratten wurden in einer Serie 2 ml, in

Tabelle 7. *Wirkung des Sandosten auf das experimentelle Lungenödem*

	Ammonchlorid-Vergiftung		Sauerstoff-Vergiftung	
	Vorbehandelte	Kontrolltiere	Vorbehandelte	Kontrolltiere
Lungenödem (+++) .	4	2	4	4
Lungenödem (++) . .	5	5	4	4
Lungenödem (+) . . .	1	3	—	—
Ödemfrei	—	—	—	—
Überlelend	1	1	—	—
Rel. Lungengewicht . .	1,81 ± 0,151	1,98 ± 0,127	1,72 ± 0,081	1,96 ± 0,125

der anderen 5 ml der Lösung/kg Körpergew. 15 min vor dem Hauptversuch intraperitoneal injiziert; die voneinander in keiner Weise abweichenden Ergebnisse beider Gruppen können gemeinsam abgehandelt werden.

11 Versuchs- und 11 Kontrolltieren wurde Ammonchlorid injiziert. Je eines überstand die Vergiftung, sonst betrug die mittlere Lebensdauer 37 min in der ersten, 45 min in der zweiten Gruppe nach Versuchsbeginn. Die Durchschnittswerte der relativen Lungengewichte waren nahezu identisch. Histologisch erwies sich das Ödem als etwa gleichen Grades in beiden Gruppen.

Je 8 Tiere sind einer 3stündigen O_2-Exposition erlegen. Die mikroskopische Untersuchung der Lungen hat gleichmäßig schweres Ödem in der Versuchs- und Kontrollgruppe vorgefunden, der Lungengewichtsquotient zeigte eine geringe Verschiebung zugunsten der vorbehandelten Ratten.

Das Mittel besitzt demnach keine sichere protektive Wirkung bei den untersuchten Lungenödemformen.

8. Irgapyrin. Der Mischung von Butazolidin und Amidazophen wurden besonders starke membrandichtende Eigenschaften zugeschrieben (Wilhelmi u. Domenjoz). Unsere Versuche, ihre Wirkung die am experimentellen Lungenödem zu prüfen, waren erfolglos, da

die mit den üblichen Dosen (100mg/kg Körpergew.) vorbehandelten Tiere sowohl der Ammonchlorid- als auch der Sauerstoffvergiftung in derart kurzer Zeit — viel eher als die Kontrollen — erlagen, daß es nicht zur Ausbildung eines Lungenödems kommen konnte. Die Erhöhung der Toxicität schien auf Addition der krampferzeugenden Wirkungen zu beruhen. In einigen Experimenten versuchten wir dies mit zusätzlicher Darreichung von Urethan (0,8 g/kg) auszubalancieren; soweit es sich beurteilen ließ, hat Irgapyrin den schon beschriebenen Schutzeffekt des letzteren Mittels bei Sauerstoffvergiftung in keiner Weise beeinflußt.

Besprechung der Ergebnisse

Die Laboritsche Mischung von Chlorpromazin, Promethazin und Dolantin wies in unseren Versuchen eine hochgradige Schutzwirkung beiden untersuchten Lungenödemformen gegenüber auf. Der Ammonchloridvergiftung ist kein einziges vorbehandeltes Tier erlegen, im Gegensatz zur 90%igen Letalität der Kontrollgruppe; in der Sauerstoffkammer war die Anzahl der überlebenden zwar geringer, doch immerhin etwa dreimal so hoch als unter den Kontrollen. Die Reduktion der Sterblichkeit ging mit der des Lungenödems Hand in Hand. Es soll jedoch keineswegs behauptet werden, daß der durch die Medikation verliehene Schutz ausschließlich in einer Ödemabwehr besteht; der durch die zentralnervöse, sedative und antikonvulsive Wirkung herabgesetzte Sauerstoffbedarf dürfte zur Toleranzsteigerung gegen Lungenveränderungen und somit zum Überleben der Tiere ebenfalls beigetragen haben.

Mit keinem isolierten Bestandteile der Mischung ist ihre protektive Wirkung reproduzierbar. Chlorpromazin schützt zwar in nahezu gleichem Maße gegen die Folgen der Salmiakvergiftung — von der unbeeinflußten Bradykardie abgesehen — der O_2-Effekt wird jedoch durch das Mittel eher verstärkt. Durch Promethazin wird zwar die Entwicklung des Sauerstoffödems gehemmt, die Letalität jedoch nicht vermindert. Dolantin erweist sich in beiden Ödemformen als unwirksam.

Was den Mechanismus anbelangt, so scheint es sich weder bloß um einen narkotischen Effekt zu handeln — da durch Urethan, trotz größerer Schlaftiefe, nur das Sauerstoffödem gehemmt wurde — noch um eine Antihistaminwirkung, nachdem eine andere Substanz dieser Gruppe nur recht geringe Protektion gewährte. Es kommt unter den von Laborit u. Mitarb. beschriebenen Haupteffekten der „Mixture lytique" — Hemmung der Gegenregulationen auf Aggression und der Reaktivität des Hypophysen-Nebennierensystems, sowie Herabsetzung der Membrandurchlässigkeit — der erste und besonders der dritte Faktor in Frage, nachdem selbst totale Adrenektomie die Entwicklung des Salmiaködems eher fördert bei mäßiger Hemmung des O_2-Lungenödems (Gottsegen,

Szám u. Csornay, 1957). Zu den zentralnervösen und permeabilitätshemmenden Effekten schließen sich die von uns beobachtete Aufhebung der Salmiakbradykardie, sowie Blutdrucksenkung und Herabsetzung des peripheren Widerstandes (Ratschow) bei der Bekämpfung des Lungenödems wirksam an; durch letztere wird Ableitung der pulmonalen Blutanschoppung in den großen Kreislauf ermöglicht. Es soll schließlich nicht unerwähnt bleiben, daß nahezu alle bisher beschriebenen Wirkungen der lytischen Mixtur — wie dies besonders von Eichholtz betont wurde — bereits in nuce bekannt waren für das Novocain, auf dessen vorzüglichen protektiven Effekt bei klinischen (Gottsegen u. Kohen) und experimentellen (Gottsegen, Szám u. Csornay, 1954, 1956) Lungenödemformen bereits hingewiesen wurde. Auch sollen nach neueren Angaben (Peterson, Gibert-Queralto u. Mitarb.) beide Mittel denselben zentralnervösen Angriffspunkt in den Schaltneuronen der substantia reticularis besitzen.

Zusammenfassung

Vorbehandlung mit der lytischen Mixtur von Laborit schützt Tiere vor einem Ammonchlorid- und Sauerstoff-Lungenödem. Dieser Effekt kann mit keinem isolierten Bestandteile der Mischung reproduziert werden: durch Chlorpromazin wird nur das Salmiaködem abgewehrt, durch Promethazin dem Sauerstoffödem Einhalt geboten. Dolantin ist ohne wesentlichen Einfluß auf die Entwicklung des Lungenödems. Unter anderen zu Vergleichzwecken geprüften Mitteln zeigte nur Urethan ausgesprochene Schutzwirkung beim Sauerstoffödem.

Literatur

Aubertin, E.: J. méd. Bordeaux **1956**, 161. — Bücherl, E., u. G. Ressel: Klin. Wschr. **1956**, 430. — Cahn, J.: L'Hopital **1954**, 238. — Courvoisier, S., J. Fournel, R. Ducrot, M. Kolsky et P. Koetschet: Arch. internat. Pharmacodynamie **92**, 305 (1953). — Cruchaud, S., et G. Vermeil: zit. Herrmann, R.: Ann. Méd. lég. etc. **31**, 411 (1951). — Danese, C., e E. De Césare: Policlinico **62**, 116 (1955). — Eichholtz, F.: Dtsch. med. J. **1954**, 405. — Fischetti, B.: zit. Di Mattei, P. — Friedberg, V.: Ärztl. Forsch. **5/I**, 29 (1951). — Gibert-Queralto, J., F. Badrinas-Vancells et D. Vendrell-Vila: Semaine Hôp. **1956**, 32. — Gottsegen, G., u. K. Kohen: Acta med. Hung. **5**, 131 (1954). — Gottsegen, G., I. Szám, u. M. Csornay: Acta med. Hung. **6**, 367 (1954). — Z. inn. Med. **11**, 551 (1956). — Acta med. Hung. **1957** (im Druck). — Grandpierre, R., et P. Grognot: J. de Physiol. **46**, 375 (1954). — Grognot, P., et J. Chomé: C. r. Soc. Biol. (Paris) **148**, 1474 (1954). — Halmágyi, D., B. Kovács, P. Neumann u. I. Kenéz: Mitt. Ung. Akad. Wiss. **7**, 169 (1956) [ungarisch]. — Halpern, B. N., S. Cruchaud, G. Vermeil et J. L. Roux: Arch. internat. Pharmacodynamie **82**, 425 (1950). — Kleinsorge, H., K. Rösner u. H. H. Wittig: Med. Klin. **1955**, 1451. — Kopera, H.: Wien. klin. Wschr. **1955**, 867 und 887. — Laborit, H.: Neuralmedizin **4**, 185 (1956). — Laborit, H., R. Favre, G. Duchesne et P. Delacroix: Presse méd. **1956**, 1293. — Di Mattei, P., e A. Paolini: Arch. ital. Sci. Farmacol. **6**, 1 (1956). —

Millon, R., P. Gabrielle et M. Landry: J. Méd. Lyon. **1956**, 411. — Mullon, P.: J. Méd. Bordeaux **1956**, 286. — Nasmyth, P. A.: Brit. J. Pharmacol. **10**, 336 (1955). — Peterson, C. G.: Anesthesiology **16**, 678 und 976 (1955). — Poulsen, T.: Acta pharmacol. (Copenh.) **10**, 117 und 379 (1954). — Ratschow, M.: Dtsch. med. Wschr. **1955**, 1234. — Rothlin, E., u. A. Cerletti: Internat. Arch. Allergy a. appl. Immunol. **4**, 191 (1953). — Stone, C. A., and E. R. Loew: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **71**, 122 (1949). — Tremonti, P.: zit. Luisada, A. A.: Circulation (New York) **13**, 113 (1956). — Umdenstock, R., A. Dagorn et C. Gandok-Nicolas: Limousin med. **1954**, 23. Véghelyi, P., u. Mitarb.: Orv. Hetilap **97**, 553 (1956) [ungarisch]. — Voegtlin, R.: Strasbourg Méd. **6**, 652 (1955). — Wheatley, D.: Proc. Roy. Soc. of Medicine **47**, 5 (1954). — Wilhelmi, G., u. R. Domenjoz: Arzneimittelforsch. **1**, 151 (1951). — Winter, C.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **72**, 122 (1949).

Privatdozent Dr. G. Gottsegen, István-Krankenhaus, Nagyvárad tér 1, Budapest, IX/Ungarn

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 448—456 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Oxford
(Leiter: Prof. Dr. J. H. Burn)

Reaktion sympathischer Ganglien während der Ganglienblockade durch Nicotin

Von
U. Trendelenburg

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. März 1957)

Paton u. Perry (1953) untersuchten die Veränderungen des Ruhepotentials des oberen Halsganglions der Katze und beobachteten, daß die ganglienblockierende Wirkung des Nicotins einen zweiphasischen Verlauf hatte, da die Depolarisation der Ganglienzellen von kürzerer Dauer war als die Hemmung der synaptischen Übertragung. Die Autoren folgerten daraus, daß auf die Hemmung durch Depolarisation eine Hemmung ohne Depolarisation folge, d. h. eine Hemmung kompetetiver Art, wie sie für Hexamethonium typisch ist.

Da kürzlich gefunden wurde, daß Hexamethonium die Erregung des oberen Halsganglions durch Histamin, Pilocarpin und 5-Hydroxytryptamin (5-HT) nicht aufhebt, wurde im folgenden untersucht,

1. ob sich der zweiphasische Ablauf der Wirkung des Nicotins mit einfachen pharmakologischen Mitteln nachweisen läßt und

2. ob die genannten drei Substanzen während der zweiten kompetetiven Phase des Nicotinblocks wieder wirksam sind. Es wurden dazu sowohl Nicotin-ähnliche Substanzen (Nicotin, Acetylcholin, Tetramethylammonium) verwandt, wie auch solche ganglienerregenden Substanzen, von denen bekannt ist, daß sie durch kompetetive Ganglienblocker nicht gehemmt werden (*Kaliumchlorid* — Brown u. Feldberg, 1936; Acheson u. Pereira, 1946; *Histamin* und *Pilocarpin* — Trendelenburg, 1954; 5-HT — Trendelenburg, 1956).

Methodik

Es wurden 34 Katzen von 2—5 kg Gewicht in Chloralosenarkose (80 mg/kg i.v.) verwandt. Intra-arterielle Injektionen in die Blutversorgung des oberen Halsganglions erfolgten durch eine in den zentralen Stumpf der A. lingualis eingebundene Kanüle. Während der Injektion von 0,1—0,2 ml der jeweiligen Losung wurde die A. carotis ext. abgeklemmt, so daß die injizierte Substanz vom Blutstrom zum Ganglion getragen wurde. In den meisten Versuchen waren beide A. linguales kanüliert. Intravenöse Injektionen erfolgten in die V. femoralis, der arterielle Blutdruck wurde von der A. femoralis mit einem Quecksilbermanometer registriert.

Die Bewegungen der Nickhaut wurden mit einem Stirnschreiber auf ein Rußkymographion übertragen.

Um zentrale Wirkungen auszuschließen, wurden in allen Versuchen die präganglionären Fasern durchtrennt. Für die elektrische Reizung der präganglionären Fasern wurde der sympathische Halsstrang freipräpariert und auf Platinelektroden gelegt. Für postganglionäre Reizung mußte das Ganglion freigelegt werden. Eine Platinelektrode wurde um die postganglionären Fasern gelegt, während die andere (indifferente) in die Muskulatur des Halses eingestochen wurde. Das Ganglion und seine prä- und postganglionären Fasern wurden mit warmem flüssigem Paraffin bedeckt. Die elektrische Reizung geschah mit Rechteckimpulsen von 0,5 msec Dauer mit einer Frequenz von 15/sec.

Für intra-arterielle Injektionen wurden die Lösungen durch Zugabe von isotonischer Bicarbonatlösung auf p_H 7 gebracht. Es wurden folgende Substanzen verwandt: Acetylcholinbromid, Hexamethoniumbromid, Histamindichlorid, 5-Hydroxytryptamin-kreatininsulfat, Kaliumchlorid, Nicotintartrat, Pilocarpinnitrat und Tetramethylammoniumbromid. Die Gewichtsangaben beziehen sich auf die Salze.

Ergebnisse

A. Intravenöse Injektionen von Nicotin

Wegen der exzessiven Reaktion des Blutdruckes ist es kaum möglich, eine völlige Hemmung des oberen Halsganglions durch eine intravenöse Injektion von Nicotin auszulösen. Eine Blockade des Ganglions wurde daher durch eine Serie von rasch aufeinanderfolgenden intravenösen Injektionen von Nicotin erzielt, wobei die Dosis von 1 mg auf 2, 5 und 10 mg gesteigert wurde. Die letzte Dosis von 10 mg wurde wiederholt, bis weder die Nickhaut, noch der Blutdruck auf Nicotin reagierten. Das war gewöhnlich nach 28—38 mg der Fall.

60—90 sec nach der letzten intravenösen Injektion von 10 mg Nicotin wurden ganglienerregende Mengen von Acetylcholin (50 μg — 4 Versuche), Tetramethylammonium (10 μg — 2 Versuche), Kaliumchlorid (4 mg — 8 Versuche), Histamin (10—30 μg — 5 Versuche), Pilocarpin (10—30 μg — 2 Versuche) und 5-HT (10—50 μg — 7 Versuche) intra-arteriell zum Ganglion injiziert. In allen Fällen war die Wirkung sowohl dieser Substanzen als auch die von supramaximaler präganglionärer Reizung (6 Versuche) beseitigt (Abb. 1c). 15–20 min später war die Wirkung von Acetylcholin (ACh), Tetramethylammonium (TMA) und von präganglionärer Reizung immer noch deutlich abgeschwächt oder völlig abwesend, während intra-arterielle Injektionen von Kaliumchlorid, Histamin, Pilocarpin und 5-HT wieder voll wirksam waren.

Das unterschiedliche Verhalten der „nicotin-ähnlichen" und der „nicht-nicotin-ähnlichen" Substanzen wurde deutlicher, als 30 min nach der ersten eine zweite Serie von intravenösen Injektionen von Nicotin gegeben wurde. Die Wirkung der ersten Serie war noch nicht abgeklungen, so daß die zweite Serie zu einer sehr geringen oder zu keiner Reaktion

des Blutdruckes oder der Nickhaut führte. Kurz darauf folgende intraarterielle Injektionen von ACh oder TMA blieben in jedem Fall ohne Wirkung, wie auch die elektrische Reizung der präganglionären Fasern. Kaliumchlorid, Histamin, Pilocarpin und 5-HT waren zu diesem Zeitpunkt jedoch immer wirksam (Abb. 1d). (Zahl der Versuche wie oben.) Nach weiteren 30 min wurde eine dritte Serie von intravenösen Nicotininjektionen gegeben und die Dosis verdoppelt. Die ganglienerregenden

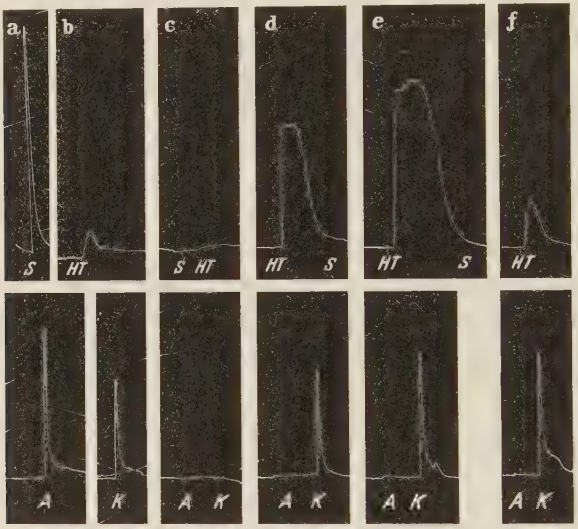


Abb. 1. Katze, 3,2 kg, in Chloralosenarkose, 1 mg/kg Atropin i.v. vor *a*. Obere Kurve: rechte Nickhaut; untere Kurve: linke Nickhaut. Supramaximale präganglionäre Reizung für 5 sec bei *S*. Intraarterielle Injektionen von 10 μg 5-HT (HT), 50 μg ACh. (*A*) und 4 mg Kaliumchlorid (*K*) 3 Serien von i.v. Nicotininjektionen, die erste (insgesamt 38 mg) unmittelbar vor *c*, die zweite (38 mg) vor *d*, die dritte (78 mg) vor *e*. I.v. Injektion von 10 mg Hexamethonium 3 min vor *f*. Zeitintervall zwischen *b* bis *f* je 30 min

Substanzen verhielten sich wie nach der zweiten Serie: Die nicotinähnlichen (ACh und TMA) waren wirkungslos, die anderen aber wirksam (Abb. 1e).

Wie Abb. 1 zeigt, war die Wirkung von 5-HT nach der zweiten und dritten Serie intravenöser Nicotininjektionen nicht nur wiederhergestellt, sondern deutlich verstärkt. Das gleiche wurde beobachtet nach der Reizung des Ganglions durch Histamin (Abb. 2) und Pilocarpin. Kaliumchlorid jedoch erreichte lediglich seine anfängliche Wirkung (Abb. 1d und e). Die intravenöse Injektion von 10—20 mg Hexamethonium (das in der Abwesenheit von Nicotin die ganglienerregende Wirkung von Histamin, Pilocarpin und 5-HT nicht zu hemmen vermag — Trendelenburg, 1954, 1956) normalisierte die verstärkte Wirkung dieser drei Substanzen, d. h. es verminderte sie auf den Ausgangswert, ohne sie zu

beseitigen (6 Versuche). Die nicht verstärkte Wirkung des Kaliumchlorids dagegen wurde unter diesen Bedingungen durch Hexamethonium nicht beeinflußt (6 Versuche — Abb. 1f).

Intra-arterielle Injektionen von Histamin riefen gewöhnlich nur eine Reizung des oberen Halsganglions hervor, nur in einem Versuch trat auch eine Reizung des Nebennierenmarks ein. Abb. 2 zeigt diesen Versuch, in dem 30 μg Histamin zum rechten oberen Halsganglion injiziert wurde. Sofort nach der Injektion trat eine Kontraktion der rechten Nickhaut auf (Abb. 2a, obere Kurve), die durch eine Reizung des Ganglions bedingt war. Nach einer Latenzzeit von 15—20 sec folgten gleichzeitig ein sekundärer Blutdruckanstieg und eine Kontraktion der linken Nickhaut. Da Histamin keine direkte Wirkung auf die Nickhaut besitzt und die nervösen Verbindungen zu den höheren Zentren durchtrennt waren, mußte die Kontraktion der linken Nickhaut durch eine Reizung des Nebennierenmarks ausgelöst sein.

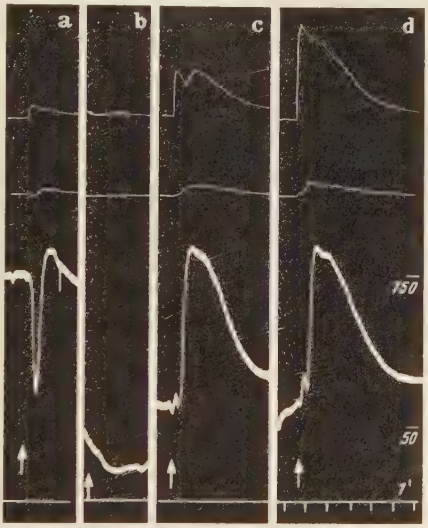


Abb. 2. Katze, 2,3 kg, in Chloralosenarkose. Oben: rechte Nickhaut; Mitte: linke Nickhaut; unten: arterieller Blutdruck. Intra-arterielle Injektion von 30 μg Histamin zum rechten oberen Halsganglion (Pfeil). 3 Serien i.v. Nicotininjektionen, die erste (38 mg) unmittelbar vor *b*, die zweite (38 mg) vor *c*, die dritte (78 mg) vor *d*. Zeitintervall zwischen den Kurven je 30 min

Als die Injektion von Histamin nach völliger Lähmung aller sympathischer Ganglien durch eine Serie intravenöser Nicotininjektionen wiederholt wurde, waren die Reizung des oberen Halsganglions und des Nebennierenmarks sowie der sekundäre Blutdruckanstieg völlig beseitigt (Abb. 2b). Nach einer zweiten und dritten Serie von Nicotininjektionen ließen sich aber nicht nur die Reizung des oberen Halsganglions, sondern auch die Reizung der Nebennieren und der sekundäre Blutdruckanstieg wieder auslösen (Abb. 2c und d).

B. Intra-arterielle Injektionen von Nicotin

Die geschilderten Versuche hatten die zweiphasische Wirkung des Nicotins bestätigt. Während der ersten Phase der Hemmung waren alle ganglienerregenden Substanzen wirkungslos, während der zweiten vermochten jedoch die nicht-nicotin-ähnlichen Substanzen das Halsganglion zu erregen, obgleich die Wirkung nicotin-ähnlicher Substanzen

völlig gehemmt war. Die zweiphasische Wirkung des Nicotins konnte in einem Versuch nicht zweimal demonstriert werden, da die Wirkung der hohen intravenösen Nicotininjektionen zu lange anhielt. Zur Darstellung des Überganges von der ersten in die zweite Phase des Nicotinblocks mußten daher intra-arterielle Injektionen von kleinen Nicotinmengen gegeben werden.

Eine lang anhaltende Hemmung des Ganglions wurde durch eine Serie von 7 intra-arteriellen Injektionen von je 100 μg Nicotin erzielt; das Zeitintervall zwischen den Injektionen betrug 90 sec. Bereits die

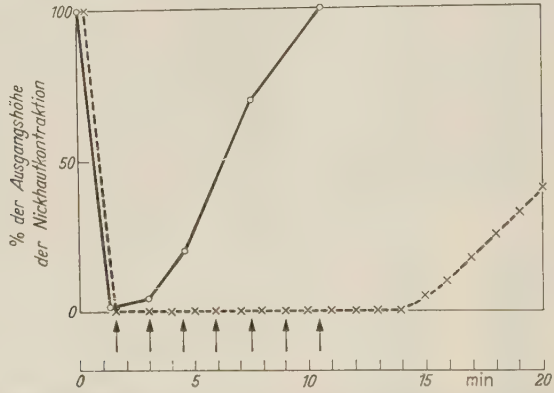


Abb. 3. Zweiphasische Hemmung des oberen Halsganglions in der Anwesenheit von Nicotin. Katze, 3 kg, in Chloralosenarkose. Ausgezogene Linie: Wirkung intra-arterieller Injektionen von 4 mg Kaliumchlorid; die Injektionen wurden zu verschiedenen Zeiten während wiederholter Serien von je 7 Injektionen (Pfeile) von je 100 μg Nicotin gegeben. Gestrichelte Linie: Wirkung von supramaximaler präganglionärer Reizung während und nach einer Serie von 7 Nicotininjektionen. Einzelheiten siehe Text

erste Nicotininjektion hob die Überleitung präganglionärer Reizung auf; diese blieb während der ganzen Serie von Nicotininjektionen gehemmt, um erst 5 min nach der letzten Injektion die ersten Anzeichen von Erholung zu zeigen (Abb. 3, gestrichelte Linie). Diesem Verhalten entsprach die Wirkung des Nicotins: Nur die erste Injektion löste eine Reizung des Ganglions aus, die folgenden führten zu keiner Kontraktion der Nickhaut.

Zur Prüfung der Wirkung des Kaliumchlorids wurde diese Serie von intra-arteriellen Nicotininjektionen halbstündlich (nach völliger Erholung des Ganglions) wiederholt, wobei jeweils eine der Nicotininjektionen durch eine intra-arterielle Injektion von 4 mg Kaliumchlorid ersetzt wurde. Die Wirkung von Kaliumchlorid war fast vollständig gehemmt, wenn diese Substanz nach ein oder zwei Injektionen von Nicotin gegeben wurde (Abb. 3, ausgezogene Linie). Je später jedoch die Injektion von Kaliumchlorid innerhalb der Serie von 7 Nicotininjektionen erfolgte, desto wirksamer wurde sie; nach sieben vorausgegangenen Injektionen

von Nicotin war die Wirkung des Kaliumchlorids nicht mehr abgeschwächt. Am Ende des Versuches wurde Kaliumchlorid wieder nach nur einer Nicotininjektion injiziert; seine Wirkung war erneut beseitigt.

In zwei weiteren Versuchen wurden ähnliche Beobachtungen gemacht: Die Wirkung intra-arterieller Injektionen von Kaliumchlorid war beseitigt, wenn die Injektionen nach 1—2 intra-arteriellen Injektionen von Nicotin erfolgten; nach 5—7 vorausgegangenen Nicotininjektionen war aber Kaliumchlorid wieder wirksam trotz vollständiger

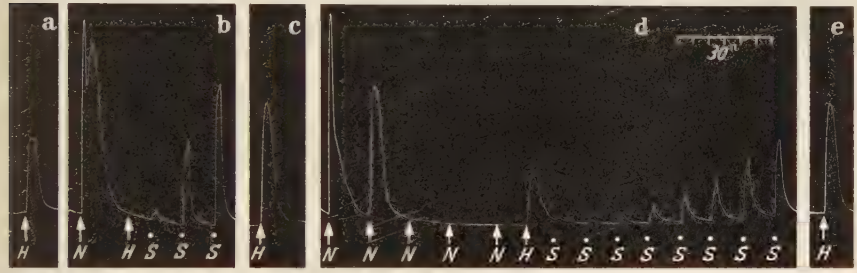


Abb. 4. Katze, 5 kg, in Chloralosenarkose; Nickhaut. Intra-arterielle Injektion von 5 μg Histamin bei *H* und von 200 μg Nicotin bei *N*. Supramaximale präganglionäre Reizung bei *S*. Zeitintervall zwischen den Kurven je 15 min

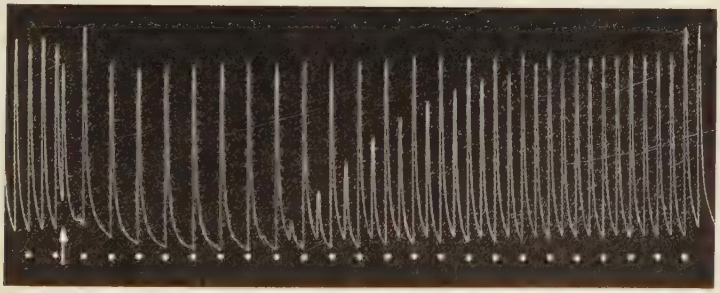


Abb. 5. Katze, 3,5 kg, in Chloralosenarkose; Nickhaut. Abwechselnde submaximale Reizung der prä- und postganglionären (Punkte) Fasern alle 30 sec für jeweils 5 sec. Intra-arterielle Injektion von 1 mg Nicotin (Pfeil). Die letzten beiden Kontraktionen wurden durch supramaximale Reizung ausgelöst

Hemmung der synaptischen Überleitung. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei Versuchen mit Histamin erhalten (Abb. 4).

Die vorübergehende Hemmung der durch Kaliumchlorid oder Histamin ausgelösten Kontraktion der Nickhaut beruhte nicht auf einer peripheren hemmenden Wirkung des Nicotins auf den glatten Muskel der Nickhaut. Bei abwechselnder elektrischer Reizung der prä- und postganglionären Fasern hemmte Nicotin lediglich die Wirkung präganglionärer Reizung (Abb. 5).

C. Intravenöse Injektionen von Tetramethylammonium

Während Paton u. Perry (1953) beim Nicotin einen zweiphasischen Wirkungsablauf feststellten, fanden sie beim TMA eine einphasische Wirkung: Die Depolarisation der Ganglienzellen und die Hemmung der synaptischen Überleitung waren von gleicher Dauer. Als Ergänzung zu den oben beschriebenen Versuchen mit Nicotin wurden in 9 weiteren Versuchen ganglienhemmende Mengen von TMA intravenös injiziert, und diese Injektionen wurden nach 20—30 min wiederholt. Eine zweiphasische Wirkung des TMA ließ sich unter diesen Bedingungen nie nachweisen. In allen Versuchen war die Wirkung von Kaliumchlorid, Histamin und 5-HT nach Injektionen von TMA beseitigt, auch dann, wenn TMA wiederholt gegeben wurde.

TMA unterschied sich von Nicotin weiterhin dadurch, daß nach der Erholung des Ganglions von der hemmenden Wirkung des TMA keine Wirkungsverstärkung von Histamin und 5-HT auftrat, und daß anschließende intravenöse Injektionen von Hexamethonium die Wirkung dieser beiden Substanzen nicht zu beeinflussen vermochten.

Besprechung der Ergebnisse

Die Versuche bestätigten die Beobachtung von Paton u. Perry (1953), daß die Hemmung des oberen Halsganglions durch Nicotin einen zweiphasischen Verlauf hat. Auf die Depolarisation der Ganglienzellen (erste Phase) folgte eine Hemmung vom kompetetiven Typ (zweite Phase). Die Wirkung nicotin-ähnlicher Substanzen (ACh, TMA) und die elektrische Reizung der präganglionären Fasern war während beider Phasen des Nicotinblocks aufgehoben. Kaliumchlorid, Histamin, Pilocarpin und 5-HT waren dagegen nur während der ersten Phase unwirksam und vermochten während der zweiten, kompetetiven Phase die Ganglienzellen zu erregen. Diese Ergebnisse stimmten überein mit der Beobachtung, daß diese vier Substanzen durch kompetetive Ganglienblocker wie Hexamethonium, Tetraäthylammonium und Curarin nicht blockiert werden (Brown u. Feldberg, 1936; Acheson u. Pereira, 1946; Trendelenburg, 1954, 1956).

Die während der ersten Phase des Nicotinblocks beobachtete Hemmung der Wirkung von Kaliumchlorid, Histamin, Pilocarpin und 5-HT wurde nicht durch eine periphere hemmende Wirkung des Nicotins auf den glatten Muskel der Nickhaut ausgelöst, da gezeigt werden konnte, daß die Nickhaut jederzeit auf die elektrische Reizung der postganglionären Fasern ansprach. Diese Wirkung des Nicotins muß auf die Depolarisation der Ganglienzellen zurückgeführt werden, zumal das gleichfalls depolarisierend wirkende TMA die gleiche Wirkung hervorrief.

Der Zeitablauf der zweiphasischen Wirkung des Nicotins hing von der Applikationsart ab. Nach intravenösen Injektionen großer Nicotinmengen

wurde eine langdauernde Hemmung des oberen Halsganglions beobachtet, die nach 30 min noch nicht abgeklungen war. Nach intraarterieller Injektion wurde Nicotin wahrscheinlich rasch wieder aus dem Ganglion ausgewaschen; die Wirkungsdauer war kurz, und die Substanz kumulierte nicht. Eine länger dauernde Hemmung des Ganglions wurde daher durch eine Serie von mehreren, in kurzen Abständen gegebenen intra-arteriellen Nicotininjektionen erzielt. Unter diesen Bedingungen konnte der Übergang der ersten in die zweite Phase des Nicotinblocks demonstriert werden (Abb. 3). Eine Gewöhnung des Ganglions an wiederholte Nicotininjektionen kann ausgeschlossen werden, da regelmäßig beobachtet wurde, daß die für die Erholung der synaptischen Überleitung benötigte Zeit mit der Zahl der Nicotininjektionen zunahm (vgl. Abb. 4b und d).

Die Versuche erlauben keine endgültige Schlußfolgerung über die Natur der während der zweiten Phase der Nicotinwirkung regelmäßig beobachteten verstärkten Reaktion der Nickhaut auf Injektionen von Histamin, Pilocarpin und 5-HT. Die Beobachtung, daß Hexamethonium (das in der Abwesenheit von Nicotin keinen Einfluß auf die Wirkung dieser drei Substanzen hat) die Wirkungsverstärkung regelmäßig normalisierte, mag dafür sprechen, daß das Ganglion stärker auf die genannten drei Substanzen ansprach. Bei einer peripheren Sensibilisierung hätte auch die Wirkung des Kaliumchlorids verstärkt sein müssen; das war nicht der Fall.

Frühere Untersuchungen (Trendelenburg, 1955) hatten gezeigt, daß der nach intravenösen Injektionen von Histamin auftretende sekundäre Blutdruckanstieg vorwiegend auf einer Reizung der Nebennieren beruhte. Die Beobachtung, daß der sekundäre Blutdruckanstieg und die durch eine Reizung der Nebenniere ausgelöste Nickhautkontraktion (Abb. 2) durch die zwei Phasen der Nicotinwirkung genau so beeinflußt wurden wie die Reizung des oberen Halsganglions, erlaubt die Folgerung, daß Nicotin auch am Nebennierenmark eine zweiphasische Wirkung ausübt.

Es wurde bisher angenommen, daß eine Substanz nicht auf Ganglien wirken könne, wenn sie in der Anwesenheit ganglienhemmender Nicotinmengen noch wirksam ist. Die Ergebnisse der hier besprochenen Versuche zeigten jedoch, daß diese Annahme nur dann zutreffend ist, wenn die ganglienerregenden Substanzen während der ersten Phase der Nicotinwirkung getestet werden. Sie ist aber falsch, wenn die Testung erst während der zweiten, kompetetiven Phase erfolgt; Substanzen mit einem Wirkungsmechanismus, der von dem des Nicotins abweicht, sind dann durchaus in der Lage, trotz der Anwesenheit ganglienhemmender Mengen von Nicotin eine Reizung der Ganglienzellen auszulösen. Diese Beobachtung ist vor allem wichtig für Präparate, in denen eine Kumulation

von Nicotin stattfinden kann. Die Frage, ob die erste oder die zweite Phase des Nicotinblocks vorliegt, kann in einfacher Weise durch die Injektion von Kaliumchlorid getestet werden. Wegen seiner kompetetiven Wirkungsphase ist das Nicotin zur pharmakologischen Analyse ganglienerregender Substanzen weniger geeignet als das rein depolarisierend wirkende TMA.

Summary

PATON and PERRY (1953) found the ganglion-blocking action of nicotine to be biphasic: nicotine blocked the superior cervical ganglion first by depolarisation of the cells and subsequently by a competitive inhibition of the acetylcholine receptors. As some ganglion-stimulating substances (KCl, histamine, pilocarpine and 5-hydroxytryptamine) are known not to be blocked by competitive inhibition of the acetylcholine receptors, the following working hypothesis has been investigated: during the depolarising phase of the nicotine block all ganglion-stimulating substances should be blocked, but during the second, competitive phase these four substances should be able to stimulate the ganglion in spite of the presence of ganglion-blocking amounts of nicotine.

In the present experiments nicotine was injected either intra-arterially into the blood supply of the superior cervical ganglion of the cat or intravenously. In both series of experiments results were obtained which agreed with the above mentioned working hypothesis. It is concluded that the generally accepted statement "a substance has no action on ganglia when active in the presence of ganglion-blocking amounts of nicotine" can only be applied to the first phase of the nicotine block. It is not correct for the second, competitive phase, as ganglion-stimulating substances which are not nicotine-like (KCl, histamine, pilocarpine, 5-HT) were able to stimulate the cells during the second phase of the nicotine block.

Nicotine was found to have no depressant action on the smooth muscle of the nictitating membrane.

Literatur

ACHESON, G., H. and S. A. PEREIRA: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **87**, 27 (1946). — BROWN, G. L., and W. FELDBERG: J. of Physiol. **86**, 10P (1936). - PATON, W. D. M., and W. L. M. PERRY: J. of Physiol. **119**, 43 (1953). — TRENDELENBURG, U.: Brit. J. Pharmacol. **9**, 481 (1954); **11**, 74 (1956). — J. of Physio. **129**, 337 (1955).

Dr. U. TRENDELENBURG, Pharmakologisches Institut, Mainz, Langenbeckstr. 1

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 457—461 (1957)

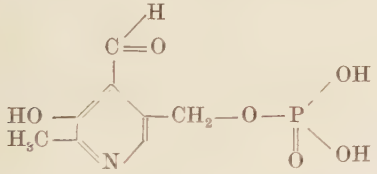
Aus dem Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg
Institut für Chemie
(Direktor: Prof. Dr. R. Kuhn)

Über den Einfluß von Pyridoxin und Pyridoxal-5-phosphat auf den Thiosemicarbazid-Krampf der Ratte

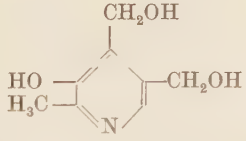
Von
G. Quadbeck und G. D. Sartori

(Eingegangen am 16. April 1957)

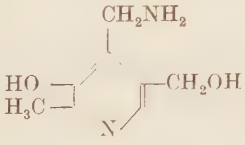
Beim alimentären Vitamin B_6-Mangel kommt es sowohl im Tierversuch[2, 3, 7] als auch beim Menschen[5, 13] zu einer deutlichen Steigerung der Krampfbereitschaft, so daß bei an sich gesunden Individuen epileptische Krämpfe auftreten können. Diese erhöhte Krampfbereitschaft wird durch Vitamin B_6-Gaben zuverlässig behoben. Die im tierischen Organismus wirksame Form des Vitamins B_6 ist Pyridoxalphosphat (I), das als Coferment von Aminosäure-Decarboxylasen und von Transaminasen wirksam ist. Im Organismus wird das Coferment aus Pyridoxin (II) oder Pyridoxamin (III), die mit der Nahrung zugeführt werden, synthetisiert.



I



II



III

Durch Thiosemicarbazid wird Pyridoxal-5-phosphat durch Reaktion mit der Aldehydgruppe *in vitro* aber auch *in vivo* inaktiviert, so daß es möglich ist, durch Verfütterung oder Injektion von Thiosemicarbazid einen Vitamin B_6-Mangelzustand herbeizuführen[6]. Dieser äußert sich, auch wenn er in dieser Weise herbeigeführt wird, neben anderen

pathologischen Erscheinungen vor allem in einem Anstieg der Krampfbereitschaft bis zum Auftreten von epileptischen Krämpfen, so daß eine Krampftherapie zur Behandlung der Schizophrenie mit Thiosemicarbazid möglich ist[8]. Durch Pyridoxin oder Pyridoxamin werden die toxischen und konvulsiven Wirkungen von Thiosemicarbazid weitgehend aufgehoben[6, 8]. Da man dem Organismus, wenn man an Stelle von Pyridoxin gleich Pyridoxal-5-phosphat zuführt, mindestens 2 Synthese-

Tabelle 1

Versuchs-Nr.	Injizierte Substanz	Zahl der Versuchstiere	Krämpfe	= % der Kontrollen
1	5 mg/kg Thiosemicarbazid	20	32	
	5 mg/kg Thiosemicarbazid + 50 mg/kg Pyridoxin · HCl	20	4	12,5
1a	5 mg/kg Thiosemicarbazid	20	32	
	5 mg/kg Thiosemicarbazid + 50 mg/kg Pyridoxal-5-phosphat	20	7	21,8
2	5 mg/kg Thiosemicarbazid	10	17	
	5 mg/kg Thiosemicarbazid + 12,5 mg/kg Pyridoxin · HCl	10	4	23,5
2a	5 mg/kg Thiosemicarbazid	20	38	
	5 mg/kg Thiosemicarbazid + 12,5 mg/kg Pyridoxal-5-phosphat	20	7	18,4
3	5 mg/kg Thiosemicarbazid	40	61	
	5 mg/kg Thiosemicarbazid + 6,25 mg/kg Pyridoxin · HCl	40	34	56
3a	5 mg/kg Thiosemicarbazid	30	45	
	5 mg/kg Thiosemicarbazid + 7,55 mg/kg Pyridoxal-5-phosphat	30	14	31

stufen, nämlich die Dehydrierung zum Aldehyd und die Phosphorylierung der Hydroxygruppe in 5-Stellung erspart, schien es möglich, mit Pyridoxal-5-phosphat eine stärkere Wirkung gegen Thiosemicarbazid-Krämpfe zu erreichen, als dies mit Pyridoxin möglich ist.

Die vorliegenden Versuche wurden durchgeführt mit Ratten eines Stammes, der eine hohe Anfälligkeitsrate für sogenannte „audiogene" Krämpfe hat. Die Anfälligkeit für solche Krämpfe, die sich durch hochfrequente Töne leicht provozieren lassen[4], wurde in der früher beschriebenen Versuchsanordnung[9, 10] geprüft. Es wurden solche Ratten ausgesucht, bei denen sich nur selten ein Krampf auslösen ließ, und in Gruppen von je 10 Tieren so verteilt, daß die durchschnittliche Krampfanfälligkeit in jeder Gruppe etwa gleich groß war. Durch mehrmalige Kontrolle wurde sichergestellt, daß niemals bei mehr als zwei Tieren einer Gruppe ein Krampf

ausgelöst werden konnte. Alle Tiere eines Versuches erhielten 5 mg Thiosemicarbazid/kg Körpergewicht in der berechneten Menge n/100 HCl gelöst i.p. injiziert. Unmittelbar danach injizierten wir den Tieren der eigentlichen Versuchsgruppen Pyridoxin · HCl („Benadon") bzw. Pyridoxal-5-phosphat* in der in Tab. 1 angegebenen Menge ebenfalls i.p. Nach 1, 3 und 5 Std wurde bei allen Tieren versucht, einen audiogenen Krampf auszulösen. In Tab. 1 ist jeweils die Gesamtzahl der beobachteten Krämpfe unter Abzug der Krämpfe, die auch ohne Medikation zu erwarten gewesen wären, angegeben. Die Zahl dieser Krämpfe ist damit ein Maß für die Steigerung der Krampfanfälligkeit. Die meisten Versuche wurden ein oder mehrmals wiederholt, wobei darauf geachtet wurde, daß jeweils die Versuchstiergruppen für die einzelnen Wirkstoffe wechselseitig ausgetauscht wurden. Hierdurch dürften Fehler, die durch eine etwaige unterschiedliche Ansprechbarkeit der einzelnen Gruppen bedingt sein konnten, weitgehend eliminiert sein. In den Versuchen 1 und 2 wurden gewichtsgleiche, im Versuch 3 äquimolekulare Mengen der Wirkstoffe injiziert.

Während bei hoher Dosierung (Nr. 1) Pyridoxin etwas wirksamer als Pyridoxal-5-phosphat zu sein scheint, ist bei niedriger Dosierung dieses Verhältnis offensichtlich umgekehrt. Es bestand die Möglichkeit, daß

Tabelle 2

Injizierte Substanz	Zahl der Versuchstiere	Krämpfe
—	10	2
50 mg/kg INH	10	3
100 mg/kg INH	10	4
200 mg/kg INH	10	10
200 mg/kg INH + 50 mg/kg Pyridoxin · HCl	10	10
200 mg/kg INH + 50 mg/kg Pyridoxal-5-phosphat	10	9
200 mg/kg INH + 200 mg/kg Pyridoxin · HCl	10	9

hohe Pyridoxin-Dosen nicht nur die konvulsive Wirkung von Thiosemicarbazid, sondern zusätzlich auch noch die ohne Medikation bereits vorhandene Krampfanfälligkeit der Ratten beeinflussen könnten, so daß bei unserer Versuchsanordnung eine stärkere Wirkung gegen die durch Thiosemicarbazid bedingte Krampfanfälligkeit vorgetäuscht werde. Daher haben wir stark krampfanfällige Ratten[10] mit Pyridoxin zu behandeln versucht. Trotz hoher Dosen bis zu 200 mg Pyridoxin/kg Körpergewicht war mit Sicherheit kein krampfmindernder Einfluß bei diesen Ratten nachweisbar. Daher scheidet diese Erklärungsmöglichkeit für die Dosis-abhängige unterschiedliche Wirkung der beiden Substanzen aus.

Da es sich um Vorgänge im Zentralnervensystem (ZNS) handelt, muß eine Substanz, die diese Vorgänge beeinflussen soll, bevor sie wirken kann, erst durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS), die Blut und ZNS voneinander trennt, dringen[11]. Für die Permeabilität der BHS gilt die Regel, daß Substanzen mit einer elektrischen Ladung, d. h. also Ionen nicht

* Versuchspräparat der Deutschen Hoffmann-La Roche A. G. Grenzach.

oder nur sehr langsam durch die BHS permeieren, während ungeladene Molekeln meist glatt hindurchzudringen vermögen[1, 12]. Deshalb kann Pyridoxin als schwache Base verhältnismäßig leicht durch die BHS, da unter physiologischen Bedingungen diese Verbindung teilweise als freie Base ohne eine elektrische Ladung vorliegt. Für Pyridoxalphosphat aber, das als Zwitterion vorliegt, stellt die BHS ein erhebliches Hindernis dar, so daß diese Verbindung nur sehr langsam ins Gehirn überzutreten vermag. Auch bei hoher Konzentration im Blut kommt daher nicht wesentlich mehr von dieser Substanz ins Gehirn als bei niedrigerem Blutspiegel. Die Dosis-Wirkungskurve verläuft zwangsläufig flacher als bei Pyridoxin, für das kein derart starkes Permeationshindernis vorhanden ist. Daher vermag bei hoher Dosierung die höhere Konzentration am Orte der Wirkung eine möglicherweise vorhandene geringere spezifische Wirkung auszugleichen.

Durch Pyridoxin und durch Pyridoxal-5-phosphat läßt sich bei der Ratte die durch Isonicotinsäurehydrazid (INH) auslösbare Neuritis weitgehend verhindern[17, 18]. Nachdem für die konvulsive Wirkung von INH ebenso wie für Thiosemicarbazid eine Inaktivierung von Pyridoxal-5-phosphat im Organismus diskutiert wird[15], haben wir versucht, auch die durch INH bedingte Steigerung der Krampfbereitschaft durch Pyridoxin oder Pyridoxal-5-phosphat zu beeinflussen. Die konvulsive Wirkung von INH ist bei der Ratte wesentlich schwächer ausgeprägt als die von Thiosemicarbazid. Da die Wirkung von 200 mg/kg Körpergewicht sehr schnell abklingt, haben wir nur einmal 1 Std nach der intraperitonealen Injektion von INH die Krampfanfälligkeit überprüft. Wie Tab. 2 zeigt, bleibt unter unseren Versuchsbedingungen die konvulsive Wirkung von INH durch Pyridoxin oder Pyridoxal-5-phosphat unbeeinflußt. Hieraus und aus der Tatsache, daß INH eine wesentlich schwächere konvulsive Wirkung hat, obwohl in vitro die Reaktionsfähigkeit gegenüber Pyridoxalphosphat keinesfalls geringer als die von Thiosemicarbazid[14] ist, glauben wir schließen zu können, daß der durch INH ausgelöste Krampf über einen anderen Mechanismus entsteht als der Thiosemicarbazid-Krampf.

Zusammenfassung

Durch Thiosemicarbazid, wie durch Isonicotinsäurehydrazid läßt sich die Anfälligkeit von Ratten für audiogene Krämpfe erhöhen. Während die Steigerung der Krampfbereitschaft durch Thiosemicarbazid von Pyridoxin und von Pyridoxal-5-phosphat weitgehend aufgehoben wird, war es nicht möglich die konvulsive Wirkung von INH durch diese Substanzen zu beeinflussen.

Der Deutschen Hoffmann-La Roche A. G. haben wir für die Überlassung der Substanzen sehr zu danken.

Literatur

[1] Becker, H., u. G. Quadbeck: Z. Naturforsch. **78**, 493 (1952). — [2] Chick, H., M. M. El Sadre and A. N. Worden: Biochemic. J. **34**, 595 (1940). — [3] Daniel, E. P., O. L. Kleine and C. D. Tolle: J. Nutrit. **23**, 205 (1942). — [4] Finger, F. W.: Psychologic. Bull. **44**, 201 (1947). — [5] György, P.: in „The Vitamins" Bd. III, New York 1954. — [6] Parks, jr. R. E., G. W. Kidder and V. C. Dewey: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **79**, 287 (1952). — [7] Patton, R. A., H. W. Karn and H. E. Langenecker: J. of Biol. Chem. **152**, 181 (1944). — [8] Pfeiffer, C. C., E. H. Jenney and W. G. Marshall: Electrencephalogr. Clin. Neurophysiol. **8**, 307 (1956). — [9] Quadbeck, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 178 (1956). — [10] Quadbeck, G., u. E. Röhm: Arzneimittelforsch. **6**, 531 (1956). — [11] Quadbeck, G., u. H. Helmchen: Dtsch. med. Wsch. (im Druck). — [12] Quadbeck, G., u. K. Randerath: Z. Naturforsch. **86**, 370 (1953). — [13] Snyderman, S. E., R. Carretero and L. E. Holt jr.: Federat. Proc. **9**, 371 (1950). — [14] Wiegand, R. G.: J. Amer. Chem. Soc. **78**, 5307 (1956). — [15] Williams, H. L., and R. G. Wiegand: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **113**, 54 (1955). — [16] Williams, H. L., and D. H. Abdulian: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **116**, 62 (1956). — [17] Zbinden, G., u. A. Studer: Internat. Z. Vitaminforsch. **26**, 130 (1955). — [18] Zbinden, G., u. A. Studer: Z. Tbk. **107**, 97 (1955).

Dr. G. Quadbeck, Heidelberg, Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Institut für Chemie

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 462—469 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Universität Pécs (Ungarn)
(Direktor: Prof. Dr. J. Méhes)

Über den biochemischen Mechanismus der Phenothiazinwirkung

Von
L. Decsi und J. Méhes

(Eingegangen am 27. März 1957)

In einer früheren Arbeit wiesen wir darauf hin (Decsi), daß zu einer Hemmung der ATP-Synthese in Gehirnhomogenaten viele kleinere Konzentrationen von Largactil [Megaphen, Chlorpromazin: N-(3-dimethylamino-propyl)-3-chlorphenothiazin] genügen, als zur Hemmung der O_2-Aufnahme, und daß das Gehirn auf die Largactilwirkung etwa fünfmal empfindlicher reagiert als Lebergewebe. Es wurde angenommen, daß in dem Wirkungsmechanismus des Largactils in erster Linie nicht die Hemmung der Oxydationsprozesse, sondern eher eine Hemmung der Phosphorylierung eine Rolle spielt.

Eine oxydationshemmende Wirkung des Largactils wurde von mehreren Verfassern nachgewiesen (Berti u. Balestrieri, Gänshirt u. Brilmeyer, Peruzzo u. Formi). Über eine die Phosphorylierung hemmende Wirkung berichtet Abood, der nachweisen konnte, daß das Largactil die Atmungskettenphosphorylierung der Gehirnmitochondrien entkoppelt. Diese Entkoppelung kann nicht auf eine Steigerung der ATP-aseaktivität zurückgeführt werden, da die ATP-aseaktivität unter dem Einfluß des Largactils eher gehemmt wird. Im Gegensatz zu Aboods Befunden haben Gressel u. Mitarb. eine Steigerung der ATP-Synthese nach Largactil in vitro gefunden, und auch in vivo nahm der ATP-Spiegel des Gehirnes der mit Largactil behandelten Tiere zu.

In der vorliegenden Arbeit beschäftigen wir uns mit einer weiteren Analyse der Wirkung der Phenothiazine. In erster Reihe versuchten wir zu entscheiden, ob jene Phenothiazinderivate, die dem Largactil chemisch nahe stehen, jedoch über dessen zentrale pharmakologische Wirkung nicht verfügen, eine largactilähnliche Wirkung auf den Stoffwechsel der Gehirnzellen ausüben oder nicht.

Methodischer Teil

Die in vitro-Versuche wurden mit Gehirngewebe von Hund und Ratte und mit Lebergewebe von Ratten durchgeführt. Für in vivo-Versuche wurden Mäuse verwendet.

1. *Die Messung der O_2-Aufnahme* geschah an Gewebsschnitten bzw. Gewebshomogenaten mit der üblichen Warburg-Methode.

2. *Oxydative Phosphorylierung.* Zur Homogenisierung des nach Dekapitation des Tieres sofort herausgenommenen Gehirns wurde folgendes Medium verwendet: (*Medium II*): 0,062 M KCl, 0,031 M $MgSO_4$, 0,008 M Nicotinsäureamid und

0,046 M NaF. Nach 3 min langer Homogenisierung (Glas-Homogenisator vom Typ Potter-Elvehjem) wurden die Homogenate 5 min lang mit etwa 800 g zentrifugiert. Als Enzymquelle wurde das Supernatans verwendet, welches im folgenden Medium suspendiert wurde (*Medium I*): 0,063 M KCl, 0,0072 M $MgSO_4$, 0,01 M Phosphatpuffer (p_H 7,4), 0,012 M $NaHCO_3$, 0,0168 M Glucose, 0,0052 M Nicotinsäureamid, 0,031 M NaF, 0,02 M Brenztraubensäure-Na, 0,002 M Apfelsäure-Na und 0,0015 M ATP-Na oder ADP-Na. Die zu untersuchenden Stoffe wurden in 1,15% KCl gelöst. Ein Gefäß enthielt 0,8 ml Supernatans, was ungefähr 60—80 mg Gehirn entsprach, sowie 0,1 ml einer Hexokinaselösung (Aktivität: 50 µmol Glucose/15 min/0,1 ml).

Nach einer Vorperiode von 7,5 min wurde der O_2-Verbrauch während 7,5 min gemessen und die auf die ganze Periode fallende O_2-Aufnahme durch Extrapolation berechnet. Die Phosphatbestimmung geschah nach der Methode von Lowry-Lopez. Alle Manipulationen wurden in mit Eis gekühlten Gefäßen und mit Lösungen um 0° C durchgeführt.

In einem Teil der Versuche haben wir nur die anorganische Phosphataufnahme, nicht aber den O_2-Verbrauch gemessen. Derartige Versuche wurden im Gegensatz zur direkten Messung der oxydativen Phosphorylierung als *Phosphatestersynthese* bezeichnet.

3. *Die Messung des energiereichen Phosphatgehaltes im Gehirn.* Diese Versuche wurden an Mäusen durchgeführt. Die Tiere wurden 45 –60 min nach Largactilbehandlung in toto in Trockeneis-Äthergemisch geworfen. Das Gehirn wurde mit eiskaltem destilliertem Wasser homogenisiert und dann mit 10%iger Trichloressigsäure enteiweißt. Die Bestimmung des Phosphokreatins geschah aus der Differenz des nach Lowry-Lopez bestimmten sogenannten „wahren anorganischen Phosphats" und des nach Fiske-Subbarow erhaltenen Phosphatwertes; die des Adenosinpolyphosphatgehalts auf Grund der salzsauren Hydrolyse.

4. *Zur Messung der ATP-aseaktivität* wurde im wesentlichen die Methode von Dubois-Potter verwendet. Homogenisierung des Gehirns in destilliertem Wasser, Puffer Veronal-HCl (p_H 7,4), Gewebsmenge 4 mg, Inkubationszeit 15 min., bei einer Temperatur von 38° C.

5. *ATP-CoA-Phosphopherase-Reaktion* wurde nach der Methode von Wollemann u. Feuer gemessen.

6. Die verwendeten *Chemikalien* waren käufliche „pro analysi" Präparate, die Phenothiazinderivate Erzeugnisse der *Spécia Rhône-Poulenc* Werke. Außer Largactil wurden noch drei andere Derivate untersucht, nämlich: *Phenergan* (Atosil, Promethazine = Dimethylamino-2-methyl-1-äthyl-N-phenothiazin), *Parsidol* (Dibutil, Pardisol = Diäthylamino-2-methyl-1-äthyl-N-phenothiazin) und *Multergan* (Padisal = Trimethylamino-2-methyl-1-äthyl-N-phenothiazin).

ATP und ADP wurden nach der Methode von Le Page, Hexokinase nach der Methode von Berger u. Mitarb. und Acetontrockenpulver von Gehirn nach der Methode von Gordon hergestellt.

Versuchsergebnisse

Die Wirkung des Largactils auf die oxydative Phosphorylierung untersuchten wir in vier Konzentrationen. Die Wirkung von $6 \cdot 10^{-5}$ Mol (21,3 µg/ml) ist in Tab. 1. die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung in Tab. 2 zusammengefaßt.

Tab. 3 zeigt die durch Largactil ausgelöste Änderung der O_2-Aufnahme in Krebs-Phosphatlösung bzw. in einem anderen Medium, das

eine viel höhere K^+-Konzentration als die übliche Krebs-Phosphatlösung enthält. Die Wirkung auf den O_2-Verbrauch der Leber ist auch in Tab. 3 dargestellt.

Tabelle 1. *Wirkung von $6 \cdot 10^{-5}$ M Largactil auf die oxydative Phosphorylierung (Gehirnhomogenat)*

Δ 0 µAtom/g/h		Δ P µMol/g/h		P/O	
Kontrollen	Largactil	Kontrollen	Largactil	Kontrollen	Largactil
228,0	174,0	456,0	203,0	2,0	1,17
174,5	152,5	525,5	379,0	3,02	2,17
228,0	152,5	571,0	326,0	2,5	2,12
137,5	138,5	248,0	134,0	1,81	0,97
117,5	175,0	205,0	161,0	1,74	0,92
191,0	164,0	390,5	203,0	2,05	1,27
181,0	181,0	342,5	238,5	1,89	1,31
Mittelwerte					
179,5	161,5	391,0	234,5	2,14	1,41
Diff. in %	—10,0		—40,1		—33,6

Tabelle 2. *Wirkung des Largactils auf die oxydative Phosphorylierung (Gehirnhomogenat)*

Zahl der Versuche	Largactil Endkonz.	P/O Ration	Hemmung in Prozenten
28	—	2,14	—
7	$6 \cdot 10^{-5}$ M	1,42	—33,6
9	$9 \cdot 10^{-5}$ M	0,88	—58,6
8	$1{,}2 \cdot 10^{-4}$ M	0,58	—72,8
4	$3 \cdot 10^{-4}$ M	0,22	—86,8

Tabelle 3. *Einfluß des Mediums auf die Hemmung der O_2-Aufnahme*

Largactil Endkonzentration	Hemmung in Prozenten		
	K^+ reiches Medium (Gehirn)	Krebs-Phosphatlösung	
		Gehirn	Leber
$6 \cdot 10^{-5}$ M	—18,8	ø	ø
$3 \cdot 10^{-4}$ M	—58,2	— 8,1	ø
$5 \cdot 10^{-4}$ M	>—70,0	—32,8	— 7,9
$6 \cdot 10^{-4}$ M	>—70,0	—63,5	—14,3

Tab. 4 zeigt die Änderung des Kreatinphosphat- und Adenosinpolyphosphatgehalts des Gehirns, 45—60 min nach subcutaner Verabreichung von 100—150 µg/g Largactil.

In Tab. 5 ist die Wirkung von $6 \cdot 10^{-4}$ Mol Largactil auf die ATP-aseaktivität der Rattengehirnzellen wiedergegeben; Tab. 6 zeigt den Einfluß derselben Konzentration auf die ATP-aseaktivität verschiedener Teile des Hundegehirnes.

Aus den Ergebnissen kann der Schluß gezogen werden, daß Largactil die Atmungskettenphosphorylierung der Nervenzellen — und in höheren Konzentrationen auch deren O_2-Aufnahme — hemmt. Die Hemmung des Oxydationsprozesses ist viel größer in kaliumreichem Medium — in welchem auch die O_2-Aufnahme viel höher ist —, als in der üblichen KREBS-Phosphatlösung.

Tabelle 4. *Veränderungen im energiereichen Phosphatgehalt des Gehirns nach Largactilbehandlung*

Behandlung	Zahl der Versuchstiere	KrP mg-%	APP mg-%
Kontrolle	11	$6{,}93 \pm 1{,}05$	$11{,}2 \pm 0{,}16$
100 µg/g	8	$7{,}86 \pm 1{,}23$	$10{,}5 \pm 0{,}94$
150 µg/g	8	$13{,}4 \pm 1{,}98^1$	$10{,}0 \pm 1{,}68$

$x^1 = p < 0{,}01$.

Tabelle 5. *Wirkung des Largactils auf die ATP-aseaktivität (Gehirnhomogenat)*

Zahl der Versuche	Largactil Endkonz.	Δ P mg/g/h	Differenz	p.
15	—	61,3	—	—
9	$3 \cdot 10^{-4}$ M	42,1	—31,5%	$< 0{,}001$
11	$6 \cdot 10^{-4}$ M	34,1	—44,4%	$< 0{,}001$

Tabelle 6. *Wirkung des Largactils auf die ATP-aseaktivität verschiedener Regionen des Zentralnervensystems (Hundegehirn)*

Zahl der Versuche	Region	Δ P mg/g/h		Differenz in Prozent
		ohne	mit	
		$6 \cdot 10^{-4}$ M Largactil		
16	Gehirnrinde	30,3	15,0	—50,3
15	Regio hypothalam.	16,6	12,1	—27,1
16	Thalamus	19,3	9,4	—50,5
16	Medulla oblongata	12,6	7,7	—38,9

Die Leber ist gegen die oxydationshemmende Largactilwirkung viel weniger empfindlich als das Gehirn; dasselbe gilt auch für die Hemmung der Phosphatestersynthese, was wir in einer früheren Mitteilung schon mitgeteilt haben.

Der energiereiche Phosphatgehalt des Gehirns nimmt in vivo nach Largactilbehandlung zu.

Die ATP-aseaktivität der Gehirnzellen wird durch Largactil in vitro gehemmt. Die gegen diese Hemmwirkung empfindlichsten Teile des Zentralnervensystems sind die Großhirnrinde und die Regio hypothalamica.

Was wir in einem wäßrigen Homogenat als ATP-aseaktivität messen, ist die Summe der Wirkungen mehrerer Enzyme, und nicht nur die alleinige Wirkung der ATP-dephosphorylierenden „wahren" ATP-ase. In erster Reihe denken wir daran, daß in wäßrigen Homogenaten neben der hydrolytischen ATP-Spaltung auch die Phosphorylierung von CoA stattfindet. Diese Reaktion spielt sich nach Wollemann u. Feuer in zwei Stufen ab:

$$1.\ \text{ATP} + \text{CoA} \longrightarrow \text{P—CoA} + \text{ADP}$$

$$2.\ \text{P—CoA} \xrightarrow[\text{Hydrolyse}]{} \text{CoA} + \text{P}.$$

Das Endprodukt der Phosphorylierung des CoA ist also in diesem System ebenso die Freisetzung eines anorganischen Phosphats aus ATP, wie bei der hydrolytischen ATP-Spaltung. Diese zwei Reaktionen können nach den Autoren folgenderweise getrennt werden: nach Dialysierung des Homogenates (24 Std gegen destilliertes Wasser bei +4° C) dialysiert der CoA-Gehalt des Homogenates hinaus, und von nun an spielt sich im Medium nur die hydrolytische ATP-Spaltung ab. Im Gegensatz hierzu geht in Acetontrockenpulver die gegen Lipoidlösungsmittel sehr empfindliche „wahre" ATP-ase zugrunde (Cseh u. Mitarb.) und bloß die Wirkung der oben erwähnten Transphosphorylierungsenzyme bleibt erhalten.

Tabelle 7. *Wirkung des Largactils auf die ATP-aseaktivität (Rattengehirn)*
Largactil Konz.: $6 \cdot 10^{-4}$ M

Homogenat[1]		Homogenat[1] nach Dialysierung		Acetontrockenpulver[2]	
Kontrolle	Larg.	Kontrolle	Larg.	Kontrolle	Larg.
44,7	21,8	23,6	12,5	16,5	21,2

[1] ΔP mg/g Feuchtgewicht/Std.
[2] ΔP mg/g Trockenpulver/Std.

Nach unseren diesbezüglichen Versuchen hemmt Largactil die ATP-aseaktivität nur in dialysierten Homogenaten, während die Phosphatübertragung von ATP auf CoA durch Largactil nicht gehemmt, sondern sogar etwas gesteigert wird (Tab. 7). Dies kann mit den Befunden von Gressel u. Mitarb. in Einklang gebracht werden, nach denen Largactil die Acetylierung von Sulfonamiden nicht beeinflußt.

Andere Phenothiazinderivate

Tab. 8 zeigt die Wirkung äquimolarer Konzentrationen von *Multergan*, *Phenergan* und *Parsidol* auf die O_2-Aufnahme der Gehirnzellen. Die Hemmwirkungen dieser Präparate sind mit der Wirkung des Largactils ins Verhältnis gesetzt, wobei die Wirkung des Largactils als 100 bezeichnet wurde.

In Tab. 9 sind die zu einer 50%igen Hemmung der Phosphatestersynthese benötigten Molkonzentrationen der Phenothiazinderivate wiedergegeben.

Tab. 10 zeigt die Wirkung äquimolarer Konzentrationen von Phenothiazinderivaten auf die ATP-aseaktivität.

Tabelle 8. *Hemmung der O_2-Aufnahme durch Phenothiazine* (Endkonz.: $3 \cdot 10^{-4}$ M, Gehirnhomogenat, K^+reiches Medium)

Verbindung	Relative Hemmungswirkung (Largactil = 100)
Parsidol	95
Multergan	122
Phenergan	63

Tabelle 9. *Wirkung der Phenothiazine auf die Phosphatestersynthese (Gehirnhomogenat)*

Zahl der Versuche	Verbindung	ID_{50}[1]
36	Largactil	$1{,}08 \cdot 10^{-4}$ M
27	Phenergan	$1{,}15 \cdot 10^{-4}$ M
18	Parsidol	$1{,}10 \cdot 10^{-4}$ M
20	Multergan	$5 \cdot 10^{-5}$ M

[1] Die zu einer 50%igen Hemmung benötigte Konzentration, berechnet nach Versuchen mit drei Konzentrationen.

Tabelle 10. *Wirkung der Phenothiazine auf die ATP-aseaktivität (Gehirnhomogenat).* Endkonz.: $3 \cdot 10^{-4}$ M

Zahl der Versuche	Verbindung	ΔP mg g h	Differenz in Prozent
11	—	61,4	- -
9	Largactil	42,1	— 31,3
6	Parsidol	62,3	+ 1,4
6	Phenergan	61,3	— 0,2
19	Multergan	79,2	+ 29,1

Aus den Versuchen mit Multergan, Phenergan und Parsidol geht hervor, daß diese Derivate den O_2-Verbrauch und die Phosphatestersynthese des Hirngewebes in gleichem Maße wie Largactil beeinflussen, doch hemmen sie die ATP-aseaktivität nicht. Multergan steigert sie sogar erheblich. Auf die O_2-Aufnahme der *Leber*zellen sind diese Derivate ebenso wie Largactil ohne Wirkung.

Besprechung der Ergebnisse

Die untersuchten Phenothiazinderivate verfügen über eine gemeinsame pharmakologische Wirkung: Dies ist ihre narkobiotische Wirkung (Decourt). Auf den Zellstoffwechsel üben sie zwei gemeinsame Wirkungen aus: Entkoppelung der Atmungskettenphosphorylierung und

Hemmung der O_2-Aufnahme der Gehirnzellen. Die Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung tritt bei der Verwendung viel kleinerer Konzentrationen auf als zur Hemmung des O_2-Verbrauches nötig sind. So kann angenommen werden, daß auch in vivo in erster Reihe diese Wirkung zum Ausdruck kommt. Die narkobiotischen Konzentrationen der Phenothiazine (Decourt) hemmen nach unseren Versuchen die oxydative Phosphorylierung um 50—70%; so liegt es nahe, daran zu denken, daß die Hemmung der oxydativen Phosphorylierung in der Auslösung der wohlbekannten narkobiotischen Wirkungen eine wichtige Rolle spielt. Diese Annahme wird durch die Beobachtung von Decourt stark unterstützt, der nachweisen konnte, daß die Phenothiazinderivate auf die Viren ohne Wirkung sind. Die Viren bekommen nämlich die lebenswichtigen Nährstoffe in einer zum Verbrauch vorbereiteten Form und benötigen deshalb auch keine oxydative Phosphorylierung. Auf dieser Grundlage kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß die narkobiotische Wirkung der Phenothiazine in der Hemmung der oxydativen Phosphorylierung eine befriedigende Erklärung findet.

Von den untersuchten Präparaten besitzt nur Largactil eine bedeutende zentrale Wirkung (Friebel, Flick u. Reichle). Auch hemmt nur Largactil die ATP-aseaktivität des Gehirns. Die Hemmung dieser Enzyme kann uns für die nach Largactil in vivo beobachtete Zunahme des energiereichen Phosphatgehaltes des Gehirns eine Erklärung geben. Offensichtlich kann diese Hemmung nur in dem Sinne gedeutet werden, daß in den Nervenzellen neben Hemmung der energieproduzierenden Vorgänge auch die Utilization der Energie unter dem Einfluß des Largactils unterdrückt wird. Die ATP-ase hemmende Wirkung des Largactils bedarf natürlich noch einer weiteren, ausführlicheren Analyse. Es ist aber auffallend, daß das einzige ATP-ase hemmende Phenothiazinderivat zugleich auch das einzige ist, das eine zentrale Wirkung besitzt.

Es besteht natürlich auch die Möglichkeit, daß Largactil deshalb eine zentrale Wirkung besitzt, weil sein Eindringen in das Zentralnervensystem wegen der Chlorsubstitution viel leichter ist, als das der anderen nicht halogenierten Phenothiazine. So lange diese Frage nicht entschieden ist, müssen wir den Standpunkt vertreten, daß die zentrale pharmakologische Wirkung des Largactils zumindest auf zwei biochemische Angriffspunkte zurückzuführen ist; und daß bei der zentralen Largactilwirkung neben der Hemmung der Energieproduktion auch die Hemmung des Energieverbrauchs der Gehirnzellen eine wichtige Rolle spielt.

Zusammenfassung

1. Die O_2-Aufnahme und ATP-Synthese der Gehirnzellen wird durch Largactil, Phenergan, Multergan und Parsidol wesentlich in gleicher Weise und in gleichem Maße beeinflußt. Alle vier genannten Präparate

haben eine ausgesprochene Nervenzellen-Spezifität; zur gleichen Hemmung des Leberzellstoffwechsels ist eine 6—8mal höhere Konzentration notwendig.

2. Der energiereiche Phosphatgehalt des Gehirns nimmt in vivo nach Largactilbehandlung zu, obwohl Largactil die Atmungskettenphosphorylierung in vitro entkoppelt.

3. Von den vier untersuchten Phenothiazinderivaten hemmt nur Largactil die Gehirn-ATP-aseaktivität, am stärksten in der Großhirnrinde und in der Regio hypothalamica. Diese Hemmung beruht wahrscheinlich auf einer Beeinflussung der „wahren", hydrolytischen ATP-ase: die Phosphatübertragung von ATP auf CoA wird durch Largactil nicht gehemmt, eher etwas gesteigert. Parsidol und Phenergan haben keinen Einfluß auf die ATP-aseaktivität, während Multergan diese steigert.

4. Aus den Versuchen wird der Schluß gezogen, daß die narkobiotische Wirkung der Phenothiazinderivate mit der Hemmung der oxydativen Phosphorylierung in befriedigender Weise erklärt werden kann, während für das Zustandekommen einer zentralnervösen pharmakologischen Wirkung — innerhalb dieser Reihe — die Hemmung der Energieproduktion allein nicht genügt. Hierfür muß wahrscheinlich auch der Energieverbrauch der Nervenzellen gehemmt werden.

Literatur

Abood, L. G., Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **88**, 688 (1955). — Berger, L., M. W. Slein, S. P. Colowick and C. F. Cori: J. Gen. Physiol. **9**, 379 (1946). — Berti, T., e A. Balestrieri: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **29**, 632 (1953). — Courvoisier, E., J. Fournel, R. Ducrot, M. Kolsky et P. Koetschet: Arch. internat. Pharmacodynamie **92**, 305 (1953). — Cseh, Gy., V. Sz. Hermann u. J. Zombori: Acta physiol. (Budapest) **5**, 353 (1954). — Decourt, Ph.: Presse méd. **1954**, 855. — C. r. Acad. Sci. (Paris) **236**, 1195 (1953). — Decsi, L.: Acta physiol. (Budapest) **10**, 387 (1956). — Dubois, K. P., and V. R. Potter: J. of Biol. Chem. **148**, 451 (1943). — Finkelstein, M., W. A. Spencer and E. R. Ridgeway: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **87**, 343 (1954). — Fiske, C. H., and Y. Subbarow: J. of Biol. Chem. **66**, 375 (1925). — Friebel, H., H. Flick u. C. Reichle: Arzneimittelforsch. **4**, 171 (1954). — Gänshirt, H., et H. Brilmeyer: Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 467 (1954). — Gordon, J. J.: Biochemic. J. **55**, 812 (1953). — Gressel, R. G., J. Mendelson and W. D. McElway: Arch. of Neur. **73**, 347 (1955). — Le Page, G. A.: Biochemical Preparations, Vol. I. New York: John Wiley and Sons 1950. — Lowry, O. H., and J. A. Lopez: J. of Biol. Chem. **162**, 421 (1946). Peruzzo, L., et R. B. Formi: Presse méd. **1953**, 1463. — Wollemann, M., u. Gy. Feuer: Acta physiol. (Budapest) **7**, 329 (1955).

Prof. J. Méhes, Pharmakologisches Institut der Medizinischen Universität Pécs, Vitéz-Utca 3 (Ungarn)

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 470—478 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Fischer)

Modifikationen zur Fluorescenzmethode von Weil-Malherbe und Bone zur Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin im menschlichen Blutplasma

Von

J. Kägi, M. Burger und K. Giger

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 7. Februar 1957)

Seit der Entdeckung, daß im Säugerorganismus neben Adrenalin auch Noradrenalin von großer physiologischer Bedeutung ist, haben verschiedene Autoren biologische Methoden zur quantitativen Bestimmung dieser beiden Amine ausgearbeitet. (Übersicht bei Euler 1956, Crawford u. Outschoorn 1951.) Die Katecholaminmengen, wie sie im menschlichen Harn und in gewissen Geweben gefunden werden (Euler u. Hellner 1951), lassen sich mit den genannten Methoden gut bestimmen. Sie genügen aber nicht, um die (gegenüber Urin) etwa 5—30mal kleineren Mengen im peripheren Blut des Menschen zu erfassen.

Lund entwickelte die erste Fluorescenz-Methode (1949/1950), die mit 50—100 ng[1] unterer Grenze die meisten biologischen Methoden an Empfindlichkeit überbot (Persky 1954). Fast gleichzeitig fand Natelson (1949), daß Adrenalin beim Erwärmen mit Äthylendiamin ein stabiles, stark fluorescierendes Produkt ergibt. Weil-Malherbe u. Bone (1952, 1953) arbeiteten auf Grund dieser Beobachtung eine Katecholaminbestimmungsmethode für menschliches Plasma aus, die eine hinreichende Empfindlichkeit bot (Grenze bei 2 ng für Adrenalin [Persky 1954]).

Gewisse Schwierigkeiten bei der Reproduktion der von Weil-Malherbe u. Bone seit 1952 veröffentlichten Versuchsergebnisse führten uns dazu, ihre Methode teilweise zu modifizieren. Es ist bemerkenswert, daß auch von anderer Seite (Manger et al. 1953, Aronow u. Howard 1955a, 1955b) Abänderungen bekanntgegeben wurden. Wir halten deshalb eine relativ ausführliche Darstellung der Methode für berechtigt.

[1] ng = 10^{-9} g.

Methode

1. Material. Natriumfluorid-Natriumthiosulfatlösung: 2 g NaF (British Drug House Ltd. „pro analysi") und 3 g $Na_2S_2O_3 \cdot 5\,H_2O$ (Riedel „p.a.") werden in 100 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird alle 2 Wochen frisch hergestellt.

Natriumcarbonatlösung: Merck „p.a." 0,5 m.

Natriumacetatlösung: Riedel „p.a." 0,2 m. Die Lösung wird vor Gebrauch mit Na_2CO_3 auf p_H 8,4 eingestellt und alle 1—2 Wochen erneuert.

Aluminiumoxyd: British Drug House Ltd. „for chromatographic adsorption analysis" wird nach folgendem Schema verarbeitet: 100 g Al_2O_3 werden in 500 ml kochender 2 n HCl (Reinigungsgrad „purissimum") 20 min gerührt, anschließend wird dekantiert und nochmals mit 500 ml heißer 2 n HCl kurz nachgewaschen. Zur Auswaschung der Säure und zur Entfernung der feineren Al_2O_3-Partikel wird ungefähr 12 mal mit je 1 l H_2O dest. gespült. Das Aluminiumoxyd wird dabei alle 5 min aufgerührt, dann läßt man 20 sec absitzen und dekantiert. Nach genügendem Auswaschen (Spülwasser-p_H um 3,7) wird das Al_2O_3 in einem großen Porzellantiegel 3 Std lang bei 300° C getrocknet.

Essigsäurelösung: Merck „p.a." 0,2 m.

Äthylendiaminhydrat: 76% Fluka, Buchs „purum", soll nach Destillation in Glasschliffapparatur möglichst selten mit Luft und Licht in Berührung kommen.

Ammoniumchlorid: Riedel „p.a." 4 m.

Natriumchlorid: Riedel „p.a.".

Isobutanol: Fluka, Buchs „purum", in Glasschliffapparatur destilliert.

Adrenalin und Noradrenalin: Farbwerke Hoechst: $5 \cdot 10^{-7}$ m in 0,2 m Essigsäure; kann bei +4° C ungefähr 2 Wochen aufbewahrt werden. Stammlösungen (0,1 m HCl) werden bei —30° C eingefroren.

Alle Lösungen und Verdünnungen werden mit glasdestilliertem Wasser hergestellt.

Fluorescenzmeßapparat: Eigenkonstruktion im Prinzip nach den Angaben von Weil-Malherbe u. Bone (1953). An Stelle einer Hg-Lichtquelle verwenden wir eine Wolfram-Autobirne (Osram, Typ: 7564, 50 W, 6 V), die durch einen Akkumulator von 8 V gespeist wird, wobei mit Hilfe einer Potentiometerschaltung an der Lampe selbst eine konstante Klemmenspannung von 6 V eingestellt und nachreguliert wird. Als Erregerlichtfilter verwenden wir ein Schott BG-12 Filter von 4 mm Dicke (Durchlässigkeitsmaximum bei 430 mμ). Als Sekundärfilter zwischen Cuvette und Multiplier dient für den grünen Bereich eine Kombination von Schott BG-7 (1,5 mm) und Schott GG-11 (2 mm), wobei das Durchlässigkeitsmaximum bei 510 mμ liegt. Für den gelb-orangen Bereich ($\sim$ 560 mμ) wird ein Schott OG-5 Filter (1 mm) verwendet. Zur photoelektrischen Messung dient uns ein „Photovoltelectronic Photometer", Typ 514 M mit Multiplier. Typ JP 28 c (neuer Typ JP 21 c).

2. Methodisches Vorgehen. 15 ml Blut werden aus der Cubitalvene mit einer 20 ml-Spritze entnommen und, bevor Gerinnung eintritt, in einem Zentrifugenglas mit 5 ml Natriumfluorid-Natriumthiosulfatlösung gemischt. Das Volumen wird genau bestimmt und die Mischung 5 min lang bei 0° C scharf zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird dann mit Pipette und Saugansatz („Propipette") sorgfältig aufgesogen. Nach Zugabe einer gleichen Menge Natriumacetatlösung wird durch Zutropfen von Natriumcarbonatlösung ein p_H von 8,4 eingestellt. Dann werden die Plasmakatecholamine an eine Aluminiumoxydsäule adsorbiert. Zu diesem Zweck dient ein Glockentrichter (etwa 50 ml Glockeninhalt) mit einem etwa 25 cm langen Trichterrohr, das einen inneren Durchmesser von 5 mm aufweist und 2 cm über dem unteren Ende verengt ist. Auf einen mit Hilfe eines Glasstabes ohne besonderen Druck eingeführten Pyrexglaswollbausch wird

0,7 g Aluminiumoxyd trocken aufgeschichtet. Um eine gleichmäßig lockere Struktur der Säule zu erhalten, wird dann glasdestilliertes Wasser durch die Säule aufgesogen bis keine Luftblasen mehr vorhanden sind und die Säule mit 5 ml Na-acetat-Lösung von p_H 8,4 vorgespült. Unter geringem, regulierbarem N_2-Druck wird die Plasmamischung mit einer Geschwindigkeit von 20—30 Tropfen/min durch die Säule getrieben. Anschließend wird mit 10 ml glasdestilliertem Wasser, welches mit einigen Tropfen Na_2CO_3-Lösung auf p_H 9,2 eingestellt wurde, nachgespült; dann folgen Elution der Katecholamine mit 5 ml 0,2 n Essigsäure und Nachspülen der Säule mit 5 ml glasdestilliertem Wasser. Das Eluat wird in Pyrexzentrifugengläsern (50 ml) mit eingeschliffenem Glasstopfen aufgefangen.

Nach Zugabe von 2 ml einer Mischung von 1,3 Teilen 4 n Ammoniumchlorid mit 1 Teil Äthylendiaminhydrat wird das Ganze 20 min lang bei 63° C im Wasserbad erwärmt und anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Extraktion der gebildeten fluorescierenden Verbindungen wird nach Zugabe von 5 g NaCl und anschließend 8 ml Isobutanol 4 min mechanisch geschüttelt und zur guten Trennung der Schichten 5 min lang bei 2000 mal g und 0° C zentrifugiert.

Um am Fluorometer Erregerlicht von konstanter Intensität zu erhalten, soll die Lichtquelle 15 min vor Gebrauch eingeschaltet und an einem leicht grün fluorescierenden Plexiglasquader mit Hilfe einer Blende geeicht werden. Zur Fluorescenzmessung werden ungefähr 6 ml der Isobutanolschicht mit Hilfe von Pipette und Propipettansatz entnommen und direkt in eine Cuvette ($10 \times 20 \times 45$ mm) aus optischem Spezialglas mit geringer Eigenfluorescenz gegeben.

Bei jeder Plasmakatecholaminbestimmung werden Standardkonzentrationen von 10^{-10} Mol (entsprechend $\sim$ 20 ng) Adrenalin bzw. Noradrenalin in 10 ml 0,1 n Essigsäure, sowie 2 Reagentien-Leerwerte mitgeführt und durch Fluorescenzmessung bestimmt.

3. Auswertung der Meßresultate. Da die Fluorescenzspektren des Adrenalin- und Noradrenalinderivates verschieden sind (Persky, 1953), lassen sich die beiden Amine durch Zwischenschaltung verschieden gefärbter Sekundärfilter differenzieren. Die Spektren überlagern sich gegenseitig, so daß die in beiden Filtern gemessenen Werte die Summen der Fluorescenzintensitäten beider Amine darstellen. Wenn S_{510} und S_{560} die Skalenteildifferenzen zwischen der unbekannten Lösung in den Sekundärfiltern $\lambda = 510$ mμ und 560 mμ und dem Leerwert sind, lassen sich die molaren Adrenalin (Am)- und Noradrenalin (Nm)-Mengen aus dem folgenden Gleichungssystem berechnen:

$$S_{510} = k_{510} \cdot Am + K_{510} \cdot Nm$$

$$S_{560} = k_{560} \cdot Am + K_{560} \cdot Nm.$$

Die Koeffizienten k_{510} und k_{560} entsprechen den in Skalenteilen gemessenen molaren Fluorescenzintensitäten der mitgeführten Eichkonzentrationen für Adrenalin und K_{510} und K_{560} für Noradrenalin. Aus Am und Nm lassen sich die molaren Konzentrationen, bezogen auf Blutplasma berechnen:

$$\text{für Adrenalin } \frac{A_m \cdot 1000}{v_1 \cdot (1-H)}$$

$$\text{für Noradrenalin } \frac{N_m \cdot 1000}{v_1 \cdot (1-H)}$$

v_1 ist das zur Bestimmung verwendete Blutvolumen in Milliliter, H ist der Hämatokritwert, der bei der Blutentnahme ermittelt wird.

Die nicht durch Katecholamine bedingte Fluorescenz (Plasmaleerwert) läßt sich durch Zugabe von 10 ml Boratlösung (31 g H_3BO_3 + 5 g NaOH in 1000 ml

H_2O) zu 10 ml Plasma und anschließender Erwärmung (15 min, 60° C) bestimmen. Da sie konstant wenig über dem Wasserleerwert liegt und keine signifikante, individuelle Unterschiede zeigt, bestimmen wir diesen Wert nicht jedesmal neu.

Bemerkungen zur Methodik

Die Schwierigkeiten bei der Anwendung der Methode von Weil-Malherbe u. Bone können auf folgende Faktoren zurückgeführt werden:

Die im Plasma zu bestimmenden Katecholaminmengen sind im Vergleich mit anderen Blutbestandteilen sehr klein. Sie liegen weit unter der Verunreinigungsquote auch gut gereinigter (sogenannter analysenreiner) Reagentien. Die chemisch-physikalischen Vorgänge bei der Isolierung der Katecholamine und der Bildung des Fluorescenzproduktes sind noch nicht genau bekannt. Da die Störfaktoren folglich weitgehend unbekannt sind, lassen sich diese Schwierigkeiten nur unter Beachtung methodisch und zeitlich streng standardisierter Versuchsbedingungen überwinden.

Einige methodische Hinweise für Abänderungen der ursprünglichen Methode von Weil-Malherbe u. Bone sollen kurz angegeben werden.

1. Material. Um Störungen durch fluorescierende Fremdsubstanzen zu vermeiden, empfiehlt es sich, alle Ausgangsreagentien mit größter Vorsicht aufzubewahren und zu behandeln. Diese werden mit Vorteil in größeren Mengen gleichzeitig bezogen, damit die Versuchsbedingungen möglichst über längere Zeit konstant gehalten werden können. Alle Destillationen werden in einer Glasschliffapparatur unter Vakuum durchgeführt.

Die Glaswaren (Pyrex) werden am besten immer nur für die nämlichen Lösungen benützt, um Kontaminationen zu vermeiden. Alle Glasgefäße, die mit Plasma in Berührung kommen, werden in Seifenlösung eingelegt, anschließend mit heißem Wasser und mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen. Die zur Kondensation verwendeten Zentrifugenröhren werden einige Stunden in eine Lösung von 0,01 m KOH mit einer geringen Menge Äthylendiamintetraacetat (etwa 0,5%) eingelegt, nachher mehrmals mit heißem und destilliertem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. In größeren Versuchsreihen zeigte es sich, daß beim Trocknen der Zentrifugengläser bei 120° der Wasserleerwert größere Schwankungen aufwies, als beim Trocknen bei Zimmertemperatur. Ebenso traten große Schwankungen auf beim mehrtägigen Stehenlassen der Gläser.

Adsorptionsröhren, Pipetten und alle anderen Glaswaren werden gleich wie die Kondensationsröhren gereinigt, dann bei 90° getrocknet. Die Cuvetten werden in eine Mischung von starker H_2SO_4/HNO_3 eingelegt.

2. Blutentnahme und Adsorption. Jegliche Hämolyse durch Koagulation in der Kanüle oder im Zentrifugenglas ist zu vermeiden. Wir stellten in solchen Fällen immer Fluorescenzwerte fest, die nach ihrer spektralen Charakteristik weder Adrenalin noch Noradrenalin entsprechen konnten. Ähnliche Veränderungen zeigten sich beim mehr als zweistündigen Stehenlassen des nichtzentrifugierten Fluorid-Thiosulfatplasmas.

Die Frage, ob durch das Zentrifugieren oder die Hypertonie der Fluorid-Thiosulfatlösung auch Katecholamine der Thrombocyten zur Messung gelangen, kann noch nicht entschieden werden. Denn es ist nicht genau bekannt, welche Mengen von Katecholaminen die Thrombocyten enthalten, und ob sie darin in einer besonderen Form gebunden sind (Weil-Malherbe, 1954b).

Die von Weil-Malherbe u. Bone (1952) angegebene Vorbehandlung der Natriumacetatlösung zur Schwermetallionenentfernung mit Zeokarb 215 wurde von uns aufgegeben, da dieses selbst fluorescierende Stoffe abgab. Durch Zugabe von Natriumdiäthyldithiocarbamat (Endkonzentration 0,002 m) in Natriumacetatlösung konnten wir auch in wäßrigen Lösungen Adrenalin und Noradrenalin vor und während der Adsorption vor Oxydation schützen und zur Messung bringen (günstig für Gewebsextrakte). Bei Anwesenheit von Plasma ist das nicht nötig, da dieses die katalytische Wirkung der Schwermetallionen offensichtlich hemmt.

Das Nachspülen der Aluminiumoxydsäule erfolgt mit Wasser, das auf p_H 9,2 eingestellt wurde. Es zeigte sich, daß die Katecholaminausbeute viel größer war als nach dem Spülen mit dem normalerweise sauren destillierten Wasser (p_H um 5).

3. Kondensation. Äthylendiamindihydrochlorid kann durch Ammoniumchlorid ersetzt werden, wobei jedoch das Mischungsverhältnis zur Äthylendiaminbase verändert werden muß, um das von Weil-Malherbe u. Bone (1952) geforderte p_H zu erhalten. Die zeitraubende Herstellung und Umkristallisation von Äthylendiamindihydrochlorid läßt sich so umgehen.

Die Kondensationstemperatur mußte in Abweichung von Weil-Malherbe u. Bone (1952) von 50° C auf 63° C gesteigert werden, da die tiefere Temperatur nicht ausreichte, um dem Plasma zugegebenes Noradrenalin quantitativ in das fluorescierende Kondensationsprodukt umzuwandeln. Da Noradrenalin in wäßriger Lösung schon bei 50° quantitativ in die fluorescierende Zwischenverbindung übergeht, kann die beobachtete Hemmwirkung möglicherweise auf miteluierte Plasmaproteine zurückgeführt werden.

Bei der Kondensation wie auch bei der Extraktion soll direktes Sonnenlicht vermieden werden, da die fluorescierenden Verbindungen

dadurch rasch zerstört werden. Indirektes Tageslicht verursachte dagegen keine Verluste, so daß uns im Gegensatz zu Aronow u. Howard (1955a) das Arbeiten im Dunkelraum nicht notwendig erschien.

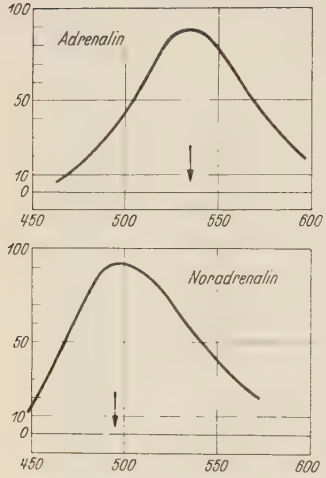
4. Fluorescenzmessung. Ähnlich wie Sonnenlicht zerstört starkes Erregerlicht (speziell dessen kurzwelliger Anteil) vor allem Noradrenalin. Durch Verwendung eines schwächeren Erregerlichtes, anderseits eines gut verstärkenden Photomultipliers und durch rasche Ablesung lassen sich solche Fehler leicht vermeiden. Da sich nach dem Umpipettieren des Isobutanols in die offene Cuvette innerhalb 3—4 min ein störender Tyndalleffekt zeigt (wahrscheinlich Äthylendiamincarbonat aus Luft-CO_2, Weil-Malherbe u. Bone 1954a), ist eine rasche Ablesung ebenfalls angezeigt.

5. Spezifität. Die Spezifität der Methode für Adrenalin und Noradrenalin wurde von Weil-Malherbe u. Bone (1952, 1953, 1954) an Rinderplasma und von Montagu (1956) am Rattengewebe mit verschiedenen Methoden geprüft. Obschon in diesen Untersuchungen die mit chemischen Methoden erzielten Ergebnisse weitgehend mit den biologischen übereinstimmten, ist es doch denkbar, daß bei den kleinen im menschlichen Plasma gefundenen Mengen auch fremde fluorescierende Substanzen wenigstens teilweise miterfaßt werden. Es wurden auch bei klinisch-experimentellen Untersuchungen tatsächlich einige den biologischen Angaben widersprechende Resultate mitgeteilt (Weil-Malherbe u. Bone 1952, 1955; Manger 1954; Holzbauer u. Vogt 1954). Dabei muß in erster Linie an strukturähnliche Stoffe gedacht werden, so an Dihydroxyphenylalanin, Hydroxytyramin, Dihydroxyphenylessigsäure (Price 1956), Dihydroxyphenylserin und Isopropylnoradrenalin. Da Hydroxytyramin im Harn in beträchtlichen Mengen ausgeschieden wird (Holtz, Credner u. Kroneberg 1947) und bei gewissen Tierarten im Nebennierenmark (Shepherd u. West 1953) und im Milznerven vorkommt (Schümann 1956), würde man auch größere Mengen im Plasma erwarten, die aber nicht gefunden werden konnten (Weil-Malherbe u. Bone 1956).

Die Interferenz folgender Stoffe konnte aus verschiedenen Gründen ausgeschlossen werden: Hydroxytryptamin wird unter unseren Versuchsbedingungen nicht an Aluminiumoxyd adsorbiert; Dihydroxyphenylalanin bildet mit Äthylendiamin ein fluorescierendes Produkt, das praktisch nicht in Isobutanol extrahiert wird: Isopropylnoradrenalin konnte bis jetzt nur in Spuren im menschlichen Nebennierenmark nachgewiesen werden (Lockett 1954).

Die Äthylendiamin-Kondensationsprodukte von Isopropylnoradrenalin, Dopamin, Epinin und Dihydroxyphenylessigsäure, Stoffe, die im Zusammenhang mit dem Adrenalin und Noradrenalin von Bedeutung sind, zeigen Maxima ihrer Fluorescenzspektren, die für die drei erstgenannten bei 525—535 mμ, also in der Nähe desjenigen von Adrenalin,

für Dihydroxyphenylessigsäure bei 500 mμ, also in der Nähe desjenigen des Noradrenalin liegen (siehe Abb. 1). Diese Stoffe kommen im Plasma nur in unmeßbar kleinen Mengen oder überhaupt nicht vor. Außerdem zeigen sie unter unseren methodischen Bedingungen eine bedeutend geringere Intensität ihrer Fluorescenz. Daher können sie höchstens eine unbedeutende Störung unserer Versuchsergebnisse für Adrenalin und Noradrenalin verursachen.



Dagegen zeigte es sich, daß 30 sec bis 2 min nach Injektion von 0,1 mg Dopa/kg beim Menschen (3 Fälle) eine starke Zunahme der dem Adrenalin entsprechenden Fluorescenz eintrat, was, berechnet auf Adrenalin, einer scheinbaren Erhöhung der Konzentration auf das zwei- bis dreifache entsprach. Die dem Noradrenalin entsprechende Fluorescenz stieg dabei nur

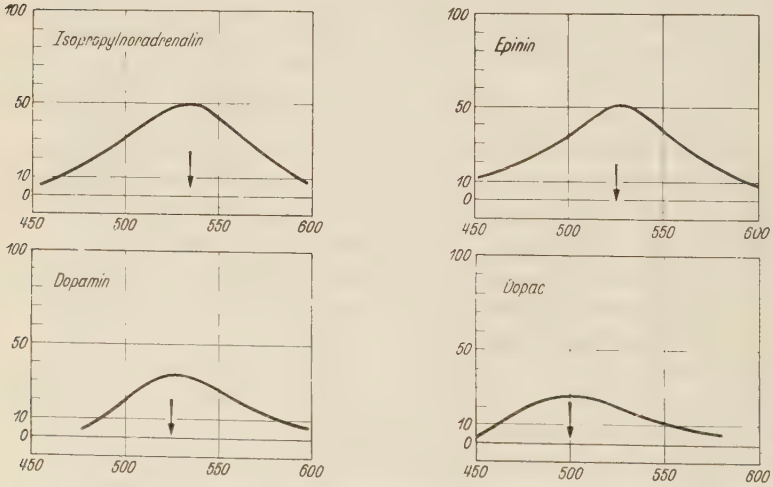


Abb. 1. Fluorescenzspektren der Äthylendiamin-Kondensationsprodukte von Adrenalin, Noradrenalin, Isopropylnoradrenalin, Dopamin, Epinin und Dihydroxyphenylessigsäure in Isobutanol, je $5 \cdot 10^{-6}$ m (Noradrenalin $3 \cdot 10^{-6}$ m), aufgenommen mit einem Farrand-Spektrofluorophotometer. Abszisse: Wellenlänge in mμ. Ordinate: relative Fluorescenzintensität in Skalenteilen des Apparates

geringgradig an. Es dürfte sich bei der fluorescierenden Substanz um Dopamin handeln, das sich in bezug auf das Fluorescenzspektrum kaum vom Adrenalin unterscheidet und im Körper durch Dekarboxylierung aus Dopa entstehen kann (Holtz, Credner u. Koepp, 1942).

6. Wiedergewinnung. In verschiedenen Mengen zugesetztes Adrenalin und Noradrenalin ließ sich sowohl aus wäßrigen Lösungen als auch aus Plasma zu 92,5 ± 5,1% respektive 92 ± 3,4% wiederfinden. Eine Wiedergewinnung von 90% wurde als Voraussetzung zur Durchführung einer Versuchsserie angesehen.

Einzelergebnisse

Mit der hier beschriebenen Methode, deren Spezifität und Reproduzierbarkeit nicht endgültig geklärt ist, führten wir verschiedene klinisch-experimentelle Untersuchungen durch.

Als Durchschnittswerte für menschliches Plasma fanden wir für Adrenalin 0,28 ng/ml Plasma und für Noradrenalin 2,56 ng/ml Plasma; dabei zeigen sich aber individuelle Schwankungen von 0—0,5 ng für Adrenalin und von 1,5—5,0 ng für Noradrenalin, die wir als normal zu betrachten haben. Die methodischen Schwankungen bei Parallelversuchen aus dem gleichen Plasma betragen bei sorgfältigem Arbeiten nur ± 0,08 ng/ml für Adrenalin und ± 0,14 ng/ml für Noradrenalin.

Ein Vergleich mit den Werten anderer Autoren zeigt folgende Tabelle.

Tabelle 1

	Adrenalin ng/ml Plasma	Noradrenalin ng/ml Plasma
Weil-Malherbe (1953)	2,2 ± 0,06	6,8 ± 0,3
Weil-Malherbe (1954)	1,6 ± 0,2[1]	6,0 ± 0,3[1]
Manger et al. (1954)	0,14	4,0
Aronow u. Howard (1955b)	0,4 ± 0,2	2,1 ± 1,3

[1] Auf Blutvolumen bezogen.

Über die Ergebnisse weiterer Untersuchungen haben wir an anderer Stelle berichtet (Burger, Giger, Kägi u. Langemann 1957; Giger 1957; Kägi 1957; Burger 1957). Die Methode ließ sich auch gut anwenden auf Adrenalin- und Noradrenalinbestimmung in verschiedenen Teilen von Phäochromocytomgewebe (Burger u. Langemann 1956).

Zusammenfassung

Modifikationen der von Weil-Malherbe u. Bone angegebenen Fluorescenzmethode zur Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin in menschlichem Blutplasma wurden beschrieben und diskutiert.

Wir danken Herrn Dr. H. Langemann für die Anregungen zur Arbeit und Diskussion.

Für die Überlassung von l-Adrenalin (Base) und l-Noradrenalin (HCl) danken wir den Farbwerken Hoechst (Werkvertretung: Plüss-Stauffer AG, Oftringen);

für Hydroxytryptamin und l-Dopa, sowie für die Möglichkeit verschiedene Fluorescenzspektren aufzunehmen, der Firma Hoffmann-La Roche, AG, Basel; für l-Isopropylnoradrenalin-HCl der Firma Cilag AG, Schaffhausen; für Epinin-HCl der Firma Wellcome Research Laboratories, Beckenham; für 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure der Firma: Astra, Aktiebolaget, Södertälje.

Literatur

Aronow, L., F. Howard and D. Wolff: Federat. Proc. **14**, 315 (1955). — Amer. Pharmacol. Soc. 1955, Iowa City b. — Burger, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol., **230**, 489 (1957). — Burger, M., K. Giger, J. Kägi u. H. Langemann: Helvet. physiol. Acta (im Druck). — Burger, M., u. H. Langemann: Klin. Wschr. **1956**, 941. — Crawford, T. B. N., and A. S. Outschoorn: Brit. J. Pharmacol. **6**, 8 (1951). — Euler, U. S. von, u. S. Hellner: Acta physiol. scand. (Stockh.) **22**, 161 (1951). — Euler, U. S. von, S. Hellner u. J. Orwén: Acta physiol. scand. (Stockh.) **33**. Suppl. **118**, 15 (1955). — Euler, U. S. von: Noradrenaline. Springfield: Charles C. Thomas **1956**. — Giger, K.: In Vorbereitung. — Holtz, P., K. Credner u. G. Kroneberg: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 228 (1947). — Holtz, P., K. Credner u. W. Koepp: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 356 (1942). — Holzbauer, M., and M. Vogt: Brit. J. Pharmacol. **9**, 249 (1954). — Kaegi, J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **230**, 479 (1957). — Lockett, F. M.: Brit. J. Pharmacol. **9**, 498 (1954). — Lund, A.: Acta pharmacol. (Copenh.) **5**, 231 (1949); **6**, 137 (1950). — Manger, W. M., E. J. Balder, E. V. Flock, J. L. Bollmann, J. Berkson and M. Jacobson: Proc. Staff Meet. Mayo Clin. **28**, 526 (1953). — Manger, W. M., E. V. Flock, J. Berkson, J. L. Bollmann and Gr. M. Roth: Circulation (New York) **10**, 641 (1954). — Montagu, K. A.: Biochemic. J. **63**, 559 (1956). — Natelson, W., J. K. Lugovoy and J. B. Pincus: Arch. of Biochem. **23**, 157 (1949). — Persky, H.: Science (Lancaster, Pa.) **118**, 381 (1953). — Methods of biochemical analysis, Vol. II, p. 64, Interscience Publ. N. Y. **1954**. — Price, H. L., and A. Valk: Federat. Proc. **15**, 469 (1956). — Schümann, H. J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 566 (1956). — Shepherd, D. M., and G. B. West: J. of Physiol. **120**, 15 (1953). — Weil-Malherbe, H., and A. Bone: Biochemic. J. **51**, 311 (1952); **58**, 132 (1954a). — Lancet **264**, 974 (1953); **271**, 282 (1956). — Nature (Lond.) **174**, 557 (1954b). — J. Ment. Sci. **101**, 733 (1955).

Dr. H. Langemann, Pharmakologisches Institut der Universität Zürich/Schweiz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 479—488 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Fischer)

Veränderungen der Adrenalin- und Noradrenalinkonzentrationen im menschlichen Blutplasma während der Äthernarkose

Von

J. Kägi

(Eingegangen am 7. Februar 1957)

Es ist seit langem bekannt, daß sich unter Äther- und Chloroformnarkosen merkliche Veränderungen im Katecholamingehalt* des Nebennierenmarks abspielen.

Die Untersuchungen von Elliott (1912), Fujii (1924) und anderen Autoren zeigten am Hund und an der Katze während Inhalationsnarkosen eine Abnahme des Nebennierenadrenalins, welche durch eine vermehrte Adrenalinausschüttung bedingt ist, wie aus Adrenalinbestimmungen im Nebennierenvenenblut, sowie im peripheren arteriellen Blut hervorging (Ogawa 1925, Schlossmann u. Mügge 1929, Watts 1954 und Richardson 1956). Obschon Kodama (1924) im Gegensatz zu diesen Befunden beim Hund in Äthernarkose eine Abnahme der Adrenalinproduktion im Nebennierenmark beobachtete, wiesen auch kreislaufdynamische und metabolische Veränderungen bei der gleichen Tierart auf eine gesteigerte Adrenalin- bzw. Noradrenalinsekretion hin (Elliott 1912, Brewster et al. 1953 u. 1953, Bunker et. al. 1951). Da beim Menschen nur sehr geringe Katecholaminmengen im peripher zirkulierenden Plasma vorhanden sind, konnte bis vor kurzem nur indirekt aus Stoffwechsel- und Kreislaufanalysen auf mögliche Änderungen im Blutkatecholamingehalt zurückgeschlossen werden.

Franken u. Schürmeyer (1928) sowie Reisinger u. Schneider (1929) fanden in tiefer Äthernarkose eine starke Verminderung der zirkulierenden Blutmenge, wobei auch der Blutdruck immer deutlich abfiel. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu denjenigen beim Hund, passen aber zu den Angaben von Bunker (1951), welcher die in Äthernarkose beim Hund immer beobachtete, für eine Adrenalinausschüttung typische metabolische Acidose beim Menschen nicht finden konnte.

Diese auffallenden Unterschiede lassen eine einfache Gleichsetzung der Narkoseverhältnisse von Mensch und Laboratoriumstier nicht zu und erfordern daher eine genauere Abklärung am Menschen selbst.

Mit der Entwicklung fluorometrischer Bestimmungsmethoden (Lund 1949, Weil-Malherbe u. Bone 1952) wurde es möglich, die Wirkung der Narkose auf die Plasmakatecholaminkonzentration auch beim Menschen im peripheren Blut zu verfolgen. Weil-Malherbe (1955) und Montagu (1955) fanden so bei leichten Barbi-

* Als Katecholamine werden Adrenalin und Noradrenalin zusammengefaßt. Da körpereigenes Noradrenalin erst seit etwa 1947 von Adrenalin unterschieden wird, sollten die bei älteren Autoren angegebenen biologisch bestimmten Adrenalinmengen eher als Gesamtkatecholaminmengen interpretiert werden.

turat- und Thiobarbituratnarkosen eine Verminderung der Adrenalinkonzentration, während sich die Noradrenalinkonzentration wenig und ungleich änderte. Obschon Äther das am meisten verbreitete Narkoticum ist, wurden bisher beim Menschen keine Katecholaminbestimmungen unter Äthernarkosen bekannt. Wenn wir von den unvollständigen Angaben von Manger et al. (1954) absehen, wurden auch mit andern Narcotica nie tiefe Narkosen, die mit Blutdruckabfall einhergingen, untersucht.

Da jedoch gerade die Aufrechterhaltung des Kreislaufes in der tiefen Narkose und auch bei anderweitig entstandenen Blutdruckkrisen eine Hauptaufgabe des Anaesthesisten darstellt, dürfte eine Abklärung der Plasmakatecholaminverhältnisse in der tiefen Äthernarkose auch als Beitrag zum Aufbau einer experimentell-physiologisch fundierten Narkosetechnik nützlich sein. Auch wenn wir Gelegenheit hatten, nur eine geringe Zahl von Narkosen zu untersuchen, so glauben wir doch, daß diese wenigen Ergebnisse für weitere Arbeiten richtunggebend sein können.

Versuchsanordnung und Bestimmungsmethode

Die Adrenalin- und Noradrenalinbestimmungen wurden an Patienten der Anaesthesieabteilung des Kantonsspitals Zürich (Leiter: Dr. G. Hossli) ausgeführt. Um die durch die Verschiedenheit der Art des operativen Eingriffs bedingten Faktoren auszuschalten und auch um eine immer gleiche, durch die Spezifität der Operation geforderte Narkosetiefe zu erreichen, wurden möglichst nur Patienten mit der gleichen chirurgischen Indikation ausgewählt. Es handelte sich in sieben Fällen um eine einfache Meniskusentfernung im Kniegelenk und in einem Fall um eine Epididymektomie. Das Alter der Patienten, sieben Männer und einer Frau, variierte zwischen 20 und 51 Jahren. Die Äthernarkosen wurden in sechs Fällen mit der Schimmelbusch'schen Maske, also im offenen System, durchgeführt und in einem Fall im geschlossenen System. Zur Einleitung diente in diesem letzteren Fall die Kombination von Narconumal (= N-methyl-allyl-isopropylbarbitursaures Natrium), intravenös gegeben und von Lachgas — Sauerstoff — Beatmung, bei den Schimmelbuschnarkosen wurde nur Narconumal verwendet, wobei die Dosen zwischen 0,5 und 1,0 g lagen. Die Einleitungsdauer war in keinem Fall kürzer als 20 min und die totale Narkosezeit bewegte sich zwischen 60 und 90 min, die Operationszeit zwischen 25 und 65 min. Als Praemedikation erhielten alle Patienten am Vorabend ein Barbituratdurchschlafmittel, vier Patienten dazu je 50 mg Phenergan, ferner erhielten alle eine Stunde vor Narkosebeginn je 0,01 g Morphin s. c. und 30 min später 0.5 mg Atropin s. c. Während der Narkose wurde einem Patienten (3) nochmals 0,25 mg Atropin intravenös appliziert. Vor, mehrmals während und nach der Narkose wurden Puls und Blutdruck bestimmt, ebenso bei jeder Blutentnahme. Das zur Katecholaminbestimmung notwendige Blut (i. d. Regel 15 ml) wurde ebenfalls vor, während und nach der Narkose aus der Kubitalvene entnommen. Die *erste Entnahme* erfolgte unmittelbar vor der Narconumalinjektion, nur in einem einzigen Fall (8) erst nach dieser, aber noch vor Beginn der Äthernarkose. Die *zweite Entnahme* fand bei allen Patienten im Stadium der chirurgischen Vollnarkose, im Toleranzstadium statt, wobei der Entnahmezeitpunkt bei sechs Patienten mit dem Minimum des mittleren Blutdruckes zusammenfiel. Bei einem der zwei übrigen Patienten (6) änderte sich der Blutdruck überhaupt nicht, und bei dem andern (5) wurde das Blut erst beim Wiederanstieg von Blutdruck und Puls entnommen. Die *dritte Blutentnahme* erfolgte bei drei Patienten (2), (6), (7) innert 15 min nach

Absetzen des Äthers, bei weiteren drei (1), (3), (4) nach einem Zeitintervall von mehr als 45 min nach Beendigung der Narkose. Bei zwei Patienten (5), (8) mißlangen die Katecholaminbestimmungen aus der dritten Blutportion.

Bestimmungsmethode. Die Plasmakatecholamine wurden nach der von Weil-Malherbe u. Bone (1952) beschriebenen Methode in der Modifikation von Kägi, Burger u. Giger (1957) bestimmt.

Resultate

Nach der allgemein verbreiteten Auffassung über Noradrenalin und Adrenalin als Nervenreizübermittlerstoffe und als Regulatoren des vegetativen Gleichgewichtes mußte man erwarten, daß Änderungen im Plasmakatecholamingehalt, die durch massive äußere Eingriffe, wie sie Narkose und Operation zweifellos darstellen, bedingt sind, auch in entsprechenden Veränderungen der vegetativen Funktionen ihren Ausdruck finden. In unseren Untersuchungen wurden deshalb Blutdruck und Pulsfrequenz mitgemessen und zu den ermittelten Katecholaminwerten in Beziehung gebracht. In Tab. 1 sind die Noradrenalin- und Adrenalinkonzentrationen mit ihren zugehörigen Blutdruck- und Pulsfrequenzen zusammengestellt. Die Ausgangswerte zeigten sowohl für Adrenalin wie auch für Noradrenalin große individuelle Unterschiede, wobei sich aber keine Beziehung zum Alter des Patienten, seinem Blutdruck oder seiner Pulsfrequenz feststellen ließ. Die Werte für Noradrenalin variierten zwischen 1,01 und 4,60 ng/ml Plasma (1 ng $= 10^{-9}$ g), für Adrenalin zwischen 0,04 und 1,70 ng/ml. Abgesehen von diesen unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen folgten die Plasmakatecholamine im Verlauf der einzelnen Narkosen deutlichen Gesetzmäßigkeiten; Adrenalin und Noradrenalin verhielten sich dabei nicht gleich.

Bei allen vollständig beobachteten Fällen kam es in tiefer Äthernarkose einheitlich zu einer Abnahme der *Noradrenalin*-Konzentration. Eine einzige Ausnahme scheint nur beim Patienten (6) vorzuliegen, wo uns aber leider kein Anfangswert zur Verfügung stand. Bei diesem Patienten zeigte der Plasmanoradrenalinwert nach der intravenösen Narconumalinjektion ein Minimum, stieg dann aber während der tiefen Äthernarkose fast auf den gleichen Wert an, welcher nach der Narkose bei der dritten Blutentnahme gefunden wurde.

Obschon das Plasmanoradrenalin einen einheitlichen Abfall zeigte, waren die mengenmäßigen Unterschiede im Konzentrationsabfall ziemlich groß. Sie variierten zwischen 2,10 und 0,38 ng/ml. Dementsprechend gingen die prozentualen Abnahmen auseinander, sie schwankten zwischen 20 und 73%. Nach Absetzen der Ätherzufuhr stiegen die Noradrenalinwerte in allen Fällen wieder an. Sie erreichten bei denjenigen Fällen, die innert der ersten 15 min nach Narkoseende untersucht wurden, 72—100% des Ausgangswertes, in den Fällen mit einem Interwall von mehr als 45 min 94—113%.

Tabelle 1. *Plasmanoradrenalin- und Plasmaadrenalinkonzentrationen, Blutdruckwerte und Pulsfrequenz im Verlauf von 8 Äthernarkosen*

Patient	Operation	Zeitpunkt oder Narkosetiefe bei der Blutentnahme	Noradrenalin 10^{-9} g/ml	Adrenalin 10^{-9} g/ml	Blutdruck mm Hg	Puls-frequenz	Bemerkungen
1. ♀ 47 j. 50 kg	Meniscus-entfernung	vor Narkosebeginn	4,62	—	140/90		(Bei diesem Versuch dürfen die Noradrenalinwerte nur qualitativ verwendet werden)
		Toleranzstadium	0,33	—	90/70	80	
		60 min nach Narkoseende	1,30	—	120/80	88	
2. ♂ 36 j. 36 kg	Epididymis-entfernung	vor Narkosebeginn	4,52	0,31	120/60	84	Morphin 0,01 + Atropin 0,5 mg 1 min vor Narkose-beginn injiziert i.v.
		Toleranzstadium	3,04	0,04	90/60	68	
		bei Narkoseende	3,29	0,33	100/70	80	
3. ♂ 20 j. 65 kg	Meniscus-entfernung	vor Narkosebeginn	1,01	1,70	110/80	64	20 min vor 2. Blutent-nahme 0,25 mg Atropin i.v.
		Toleransztadium	0,27	0,23	85/65	100	
		60 min nach Narkoseende	1,14	0,58	110/85	84	
4. ♂ 50 j. 75 kg	Meniscus-entfernung	vor Narkosebeginn	2,82	0,87	130/100	56	
		Toleranzstadium	2,00	0,55	85/60	60	
		45 min nach Narkoseende	2,64	0,73	105/80	68	
5. ♂ 25 j. 86 kg	Meniscus-entfernung	vor Narkosebeginn	1,13	0,26	100/65	64	sehr ängstlicher Patient „kalter Schweiß" an der Stirne
		Toleranzstadium	0,75	0,94	90/60	76	
		20 min nach Narkoseende	—	—	110/70	72	
6. ♂ 30 j. 65 kg	Meniscus-entfernung	vor Narkosebeginn	—	—	120/80	84	sehr ängstlicher Patient Herzklopfen
		nach 10 ml Narconumal i.v.	1,41	0,44	120/75	108	
		Toleranzstadium	1,64	0,42	120/75	104	
		20 min nach Narkoseende	1,77	0,42	115/70	96	

Tabelle 1 (Fortsetzung)

7. ♂ 51 j. 60 kg	Meniscus-entfernung	vor Narkosebeginn	2,00	0,89	130/70	90	
		Toleranzstadium	1,40	0,65	75/45	88	
		5 min nach Narkoseende	1,90	0,89	100/65	90	
8. ♂ 50 j. 80 kg	Meniscus-entfernung	vor Narkosebeginn	2,66	1,49	115/90	68	Äthernarkose im geschlossenen System, mit N_2O und Narconumal eingeleitet
		Toleranzstadium	1,71	1,79	90/60	76	
		Toleranzstadium	1,70	1,70	90/60	80	

Die *Adrenalin*-Konzentrationen verhielten sich im Gegensatz zu den richtungsmäßig einheitlichen Noradrenalinverschiebungen in der tiefen Narkose unterschiedlich. In vier Fällen (2), (3), (4), (7) konnte eine deutliche Abnahme, in zwei Fällen (5), (8) eine deutliche Zunahme festgestellt werden. Mengenmäßig wechselten die Abnahmen zwischen 1,47 ng/ml und 0,24 ng/ml, prozentual auf den Ausgangswert bezogen zwischen 27 und 87%. Noch größer waren die Schwankungen bei den zwei Fällen, bei denen der Adrenalingehalt anstieg. Während die Zunahme in einem Fall (8) 0,3 ng/ml ausmachte, was einem Zuwachs von 20% entspricht, stieg das Plasmaadrenalin bei dem andern Fall (5) um das mehrfache des Ausgangswertes an (um 0,68 ng/ml). In einem Fall (6) trat keine Veränderung der Plasmaadrenalinkonzentration ein. — Nach Absetzen der Ätherzufuhr glichen sich sowohl die in der Narkose angestiegenen wie auch die abgefallenen Adrenalinwerte wieder weitgehend an den Ausgangswert an.

Versucht man nun die an den Patienten während der Narkose festgestellten Konzentrationsänderungen der Katecholamine mit den gleichzeitig beobachteten Blutdruck- und Pulsfrequenzänderungen in Beziehung zu setzen, so ergibt sich die in Tab. 2 zusammengefaßte Gruppierung. In allen Fällen, bei denen eine deutliche Abnahme der Noradrenalinkonzentration eintrat, fand sich auch eine Abnahme des mittleren Blutdruckes, in einem Fall (6) änderte sich der Blutdruck überhaupt nicht, doch war dies gerade derjenige Patient, bei dem die Noradrenalinkonzentration in der tiefen Äthernarkose praktisch unverändert blieb. Es ergibt sich daraus eine klare, wenn auch statistisch nicht genügend gesicherte Beziehung zwischen Abnahme des Noradrenalingehaltes und Abnahme des mittleren

Blutdruckes in der Narkose. Desgleichen gingen auch alle Fälle mit Adrenalinabnahme in der Narkose mit einer Blutdruckabnahme einher, wobei allerdings auch das Plasmanoradrenalin vermindert war. Eine Beziehung zwischen Pulsfrequenz und Adrenalingehalt ließ sich insofern als wahrscheinlich oder möglich annehmen, als die beiden Patienten mit Adrenalinzunahme in der Narkose (5), (8) und der Patient, bei dem sich das Plasmaadrenalin nicht änderte (6), eine deutliche Pulszunahme

Tabelle 2. *Qualitative Veränderungen von Plasmanoradrenalin, Plasmaadrenalin, von Blutdruck und Pulsfrequenz bei 8 Patienten in tiefer Äthernarkose*

Qualitative Kriterien	Fälle
Abnahme des Plasmanoradrenalin um mindestens 20%	1) 2) 3) 4) 5) 7) 8)
Abnahme des mittleren Blutdrucks um mindestens 15 mm Hg	1) 2) 3) 4) 7) 8)
Abnahme des mittleren Blutdrucks um weniger als 15 mm Hg	5) 6)*
Zunahme des Plasmaadrenalins	5)
Plasmaadrenalin unverändert	6)
Zunahme der Pulsfrequenz um mehr als 10 Schläge pro Minute	3)** 5) 6) 8)
auffällig ängstliche Patienten mit neurovegetativen Zeichen von Angst	5) 6)

* hier blieb der Blutdruck ganz unverändert
**die Pulsfrequenzzunahme bei 3) ist durch eine intravenöse Atropinapplikation von 25 mg bedingt, die in tiefer Narkose etwa 20 min vor dieser Blutentnahme erfolgte.

von über 10 Schlägen aufwiesen. Interessanterweise waren zwei von diesen Patienten gerade diejenigen (5), (6), bei denen der Blutdruck wenig oder gar nicht abfiel. Beide Patienten waren im Unterschied zu den übrigen vor der Narkose sehr ängstlich, klagten über Herzklopfen und schwitzten im Gesicht auffällig. Die Zahl der Beobachtungen genügt freilich noch nicht, um daraus bestimmte Beziehungen zwischen psychisch-vegetativem Zustand und Adrenalingehalt im Blut abzuleiten.

Zwischen Ätherverbrauch, Art der Praemedikation und deren Applikationszeit und den Plasmakatecholaminveränderungen konnten keine Beziehungen gefunden werden. Ebensowenig hatten die Narkose- und die Operationsdauer einen feststellbaren Einfluß auf die Versuchsergebnisse.

Diskussion

Alle Inhalationsnarcotica zeigen in der initialen Phase ein Stadium der Anregung mit Verschiebung der vegetativen Tonuslage nach der sympathischen (ergotropen) Seite, welche sich in einem Blutdruckanstieg von 10—20 mm Hg und einer

Pulsbeschleunigung äußert. Über diese Phase liegen noch keine Katecholaminuntersuchungen vor. In dem von uns untersuchten Toleranzstadium sinkt der Druck dagegen auf ein etwas labiles Niveau ab, welches 10—20 mm Hg unter der Ausgangslage liegt (Killian 1954, p. 925). Es ist wichtig, die Katecholaminuntersuchungen bei möglichst gleichbleibenden Verhältnissen durchzuführen und alle Zustände zu vermeiden, bei denen es durch narkosefremde Faktoren wie, Anoxie (Bülbring u. Burn 1948), große Blutverluste (Watts 1956) oder starke Reizungen afferenter Nerven (Euler u. Folkow 1953) zu einer starken reflektorischen oder peripheren Katecholaminausschüttung kommt.

Als wichtigstes Ergebnis unserer Untersuchungen darf der eindeutige Noradrenalinabfall im Toleranzstadium der Äthernarkose bezeichnet werden. Rein theoretisch gedacht, könnte dieser Abfall mit verschiedenen Regulationszentrenin Beziehung gebracht werden, welche durch die Ätherwirkung eine Dämpfung erfahren, es kämen dabei in erster Linie in Frage:

a) die durch die Narkose bedingte Abschwächung der corticalen Funktionen,

b) eine Dämpfung oder Ausschaltung hypothalamischer Zentren,

c) eine Dämpfung des bulbären Vasomotorenzentrums,

d) eine Hemmung von Kreislaufreflexen, die auf das Vasomotorenzentrum wirken, besonders der vom Carrotissinus ausgehenden Blutdruckzüglerreflexe.

Zu denken ist natürlich auch an eine direkte Beeinflussung der Nebennierenmarksekretion und der adrenergischen, Noradrenalin freisetzenden Nervenendapparate.

Bleiben wir bei den zentralen Narkosefolgen, so dürfte es heute noch unmöglich sein festzustellen, ob die Hemmung corticaler Funktionen in der Narkose einen meßbaren Einfluß auf die Blutkatecholamine auszuüben vermag. Interessant ist, daß Renton u. Weil-Malherbe (1955) im Schlaf neben einer nur geringen Verminderung des Plasmanoradrenalins eine deutliche Adrenalinabnahme fanden, während v. Euler (1956) im Schlaf eine Verminderung der Noradrenalin- und Adrenalinausscheidung im Harn nachweisen konnte; doch damit sind wir bereits auch auf hypothalamische Regulationen hingewiesen. Folkow u. v. Euler (1954) ist es gelungen, bei der Katze durch differente elektrische Reizung im Hypothalamus nebeneinander Zentren zu lokalisieren, die für die Produktion von Noradrenalin und Adrenalin im Nebennierenmark verantwortlich sind. Weil-Malherbe (1955) und Manger et al. (1956) fanden bei der Elektroschockbehandlung des Menschen einen sehr starken Adrenalin- und in einem Teil der Fälle auch einen ausgesprochenen Noradrenalinanstieg.

Burger (1956) konnte durch Reserpinbehandlung beim Menschen einen Abfall der Plasmanoradrenalinkonzentration um 65% erzielen. Es scheint naheliegend, die in der Äthernarkose beoachtete Beeinflussung der Katecholaminkonzentration im Blut auf eine dämpfende Einwirkung

des Äthers auf die die Katecholaminproduktion regulierenden Zentren im Zwischenhirn zurückzuführen. Doch ist es fraglich, ob mit dieser Annahme alle unsere Befunde erklärt werden können. Ein Vergleich mit der von Burger (1957) beobachteten Noradrenalinabnahme unter Reserpinbehandlung scheint uns aufschlußreich zu sein, da Reserpin direkt auf den Hypothalamus wirkt (Bente et al. 1955, Rinaldi 1955). In Tab. 3

Tabelle 3. *Vergleich qualitativer Zusammenhänge von Blutdruck, Pulsfrequenz, und Plasmakatecholaminkonzentrationsänderungen unter Äthernarkose und unter Reserpinbehandlung* (Burger, 1957)

	Äthernarkosen	Reserpin-therapie
Totale Anzahl Fälle	8	10
Fälle *mit* Noradrenalinabfall	7	10
Fälle *mit* Noradrenalinabfall und Blutdruckabfall	7	6
Fälle *ohne* Adrenalinabfall	3	4
Fälle *ohne* Adrenalinabfall und ohne Blutdruckabfall	1	4
Fälle *ohne* Adrenalinabfall mit Angst und neurovegetativen Angstsymptomen vor der Narkose	2	
Fälle *ohne* Adrenalinabfall mit vegetativ dystonen Störungen vor der Reserpintherapie		4
Prozentualer Noradrenalinabfall	20—75%	60—70%
Mittlerer Blutdruck während der Narkose bzw. Reserpintherapie	75 mmHg	110 mmHg

sind die eigenen Plasmakatecholaminwerte sowie die Blutdruck- und Pulswerte denjenigen Burgers gegenübergestellt. In beiden Gruppen, d. h. sowohl in Äthernarkose wie unter Reserpin fällt das Noradrenalin deutlich ab. Dabei sind die Kreislaufverhältnisse durchaus verschieden. Während der Blutdruck bei den mit Reserpin behandelten Patienten teils von erhöhten Werten auf normale abfällt, teils sich überhaupt nicht ändert, fällt er in Äthernarkose fast durchwegs von normalen oder etwas übernormalen Werten auf ein Kollapsniveau ab. Die unter beiden Bedingungen beobachtete starke Noradrenalinabnahme wird aber nur im letzteren Fall regelmäßig von einer Blutdruckabnahme begleitet. Daraus könnte gefolgert werden, daß in tiefen Äthernarkosen außer dem fraglichen Einfluß auf den Hypothalamus noch ein mit der Kreislauffunktion enger verbundenes Zentrum, vielleicht das medulläre Vasomotorenzentrum, gehemmt wird. Da Noradrenalin zur Aufrechterhaltung der Blutdruckhomöostase an den sympathischen Nervenendigungen freigesetzt (Folkow u. Uvnäs 1948) und auch im Nebennierenmark bei Reizung der

Depressornerven vermehrt ausgeschüttet wird, kann die Plasmanoradrenalinkonzentration im Verlauf der Äthernarkose möglicherweise als direktes Maß für die Vasomotorenaktivität betrachtet werden. Die von uns festgestellten niedrigen Noradrenalinwerte während der Äthernarkose wären demnach ein Ausdruck für den oben bereits erwähnten Befund von Franken u. Schürmeyer (1928), daß beim Menschen in der tiefen Äthernarkose eine Kollapssituation mit allgemeiner Vasodilatation und verminderter zirkulierender Blutmenge besteht.

In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß die beim Menschen festgestellten erniedrigten Noradrenalinwerte im Gegensatz zu der von Schlossmann u. Mügge (1929) an der Katze und von Richardson et al. (1956) am Hund in Äther- und Chloroformnarkose nachgewiesenen starken Vermehrung der Plasmakatecholamine stehen. Dieser Befund bekräftigt den Gegensatz zwischen der von Blalock (1927) und von Brewster et al. (1953) beim Hund unter Äthernarkose festgestellten Steigerung des Minutenvolumens und der von Franken u. Schürmeyer (1928) und Reisinger u. Schneider (1929) beim Menschen unter gleichen Narkoseverhältnissen beobachteten Abnahme der zirkulierenden Blutmenge.

Wenig einheitlich ist in unsern Versuchen das Verhalten des Adrenalins; dies in gewissem Gegensatz zu den Feststellungen von Weil-Malherbe (1955) und von Montagu (1955), welche selbst unter schwach narkotisch wirkenden Barbiturat- bzw. Thiobarbituratdosen regelmäßig einen Adrenalinabfall bis auf 40% des Ausgangswertes beobachteten. Da Barbiturate im Unterschied zu den Inhalationsnarcotica in der Regel kein Exzitationsstadium hervorrufen, könnte man annehmen daß der festgestellte Adrenalinabfall durch eine hemmende Wirkung auf die die Adrenalinproduktion im Nebennierenmark stimulierenden Zentren des Hypothalamus bedingt ist. Inwieweit Äther im Toleranzstadium auch einen dämpfenden Einfluß auf diese Zentren ausübt, können wir nicht entscheiden, da in diesem Stadium möglicherweise bereits bulbäre reflektorische Mechanismen gehemmt werden (Woods u. Richardson 1955, 1956). Tab. 2 zeigt, daß in den Fällen mit unveränderter oder während der Narkose gesteigerter Plasmaadrenalinkonzentration eine der Adrenalinwirkung entsprechende Beziehung zu Pulsfrequenz und Blutdruck zum Ausdruck kommt. Funkenstein et al. (1954) stellten einen Regulationstyp fest, den sie bei Angst- und Beklemmungszuständen fanden, bei dem die Blutdrucksteigerung vorwiegend durch Adrenalin und nicht durch Noradrenalin unterhalten wird. Dies deckt sich mit unsern zwei Beobachtungen, daß gerade solche Patienten über Angst klagten und die entsprechenden vegetativen Symptome zeigten, bei denen das Plasmaadrenalin in der Narkose anstieg oder unverändert blieb. Es ist seit langem bekannt, daß bei ängstlichen Patienten das Exzitationsstadium der Narkose oft abnorm verläuft und länger dauert. Man könnte sich nun fragen, ob das Verhalten der Adrenalinkonzentrationen im Blut während der Narkose damit in irgend einer Beziehung steht.

Zusammenfassung

Es wurden die Plasmakatecholamine Adrenalin und Noradrenalin an Patienten in Äthernarkose nach einer fluorometrischen Methode getrennt bestimmt.

Es wurde festgestellt, daß die Plasmanoradrenalinkonzentration im Toleranzstadium der Äthernarkose unter gleichzeitigem Absinken des Blutdruckes auf 30—80% des Ausgangswertes abfällt.

Die Plasmaadrenalinkonzentration verhielt sich nicht einheitlich.

Für die Überlassung von L-Adrenalin (Base) und L-Noradrenalin (HCl) danke ich den Farbwerken Hoechst (Werkvertretung: Plüss-Stauffer AG, Oftringen).

Literatur

Bente, D., u. T. Itil: Med. Klin. **1955**, 1296. — Blalock, A.: Arch. Surg. **14**, 732 (1927). — Brewster, W. R., J. P. Bunker and H. K. Beecher: Amer. J. Physiol. **171**, 37 (1952). — Brewster, W. R., J. P. Jsaacs, and Th. Wain-Andersen: Amer. J. Physiol. **175**, 399 (1953). — Bülbring, E., J. H. Burn and N. J. de Elio: J. of Physiol. **107**, 222 (1948). — Bunker, J. P., H. K. Beecher, B. D. Briggs, W. R. Brewster and B. A. Barnes: J. Pharmacol. a. Exper. Therap. **102**, 62 (1951). — Burger, M.: Helvet. physiol. Acta **14**, C 13 (1956). — Burger, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **230**, 489 (1957). — Elliott, T. R.: J. of Physiol. **44**, 374 (1912). — Euler, U. S. v.: Noradrenaline, p. 286, Springfield: Charles C. Thomas 1956. — Euler, U. S. v.: u. B. Folkow: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 242 (1953). — Folkow, B., u. B. Uvnäs: Acta physiol. scand. (Stockh.) **15**, 365 (1948). — Folkow, B., and U. S. v. Euler: Circulation(New York) **2**, 191 (1953). zit. nach U. S. v. Euler: Noradrenaline, p. 269. — Franken, H., u. A. Schürmeyer: Narkose u. Anästh. **1**, 437 (1928). — Fujii, J., and K. Takai: J. of Biophysics **1**, 38 (1924), zit. nach Kochmann: Handbuch d. Pharmakologie **2**, 25 (1935). — Funkenstein, D. H., M. Greenblatt and H. C. Solomon: Amer. J. Psychiatr. **108**, 652 (1952). — Kägi, J., M. Burger u. K. Giger: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **230**, 470 (1957). — Killian, H., u. H. Weese: Die Narkose, Stuttgart: Georg Thieme 1954. — Kodama, S.: Tihoku J. of Exper. Med. **4**, 601 (1924), zit. nach Y. Satake: Secretion of Adrenaline and Sympathins p. 94. Tokyo: Nanzando Co., Ltd., 1955. — Manger, W. M., B. E. Schwarz, C. W. Baars, K. G. Wakim, J. L. Bollman, M. C. Petersen and J. Berkson: 20. Int. Congr. Physiol. 1956 Communications, p. 640. — Montagu, J. D.: J. Ment. Sci. **101**, 110 (1955). — Ogawa, S.: Beitr. z. Physiol. **3**, 111 (1925), zit. aus den Berichten üb. d. gesamte Physiologie **33**, 912 (1926). — Reisinger, L., u. H. Schneider: Dtsch. Z. Chir. **217**, 303 (1926). — Renton, G. H., and H. Weil-Malherbe: J. of Physiol. **131**, 170 (1956). — Richardson, J. A., A. K. Richardson, E. F. Woods and O. J. Brodie: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **116**, 49 (1956). — Rinaldi, F., and H. E. Himwich: Ann. New York Acad. Sci. **61**, 27 (1955). — Schlossmann, H., u. H. Mägge: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **144**, 133 (1929). — Watts, D. T.: Federat. Proc. **13**, 415 (1954). — Watts, D. T.: Amer. J. Physiol. **184**, 271 (1956). — Weil-Malherbe, H., and A. D. Bone: Biochemic. J. **51**, 311 (1952). — Weil-Malherbe, H.: J. Ment. Sci. **101**, 156; 733 (1955). — Woods, E. F., and J. A. Richardson: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **114**, 445 (1955); **116**, 351 (1956).

Dr. H. Langemann, Pharmakologisches Inst. der Univ. Zürich/Schweiz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 489—498 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Fischer)

Veränderungen der Adrenalin- und Noradrenalinkonzentrationen im menschlichen Blutplasma unter Reserpin

Von

M. Burger

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Februar 1957)

Nachdem die Bestimmungsmethoden für Adrenalin und Noradrenalin im menschlichen Blutplasma zuverlässiger geworden waren (Lund 1949, Crawford u. Outschoorn 1951, Weil-Malherbe u. Bone 1952), begannen verschiedene Autoren die Wirkung zentraler Pharmaka und psychischer Veränderungen auf den Blutgehalt dieser beiden Katecholamine zu untersuchen (Weil-Malherbe 1955, Diethelm et al. 1950 und Funkenstein et al. 1952). Unter anderen wies Weil-Malherbe einen Abfall des Plasmaadrenalins nach Barbituraten nach (1955).

Veränderungen im Noradrenalingehalt des Hypothalamus nach Pharmaka zeigte M. Vogt, die nicht allein auf Unterschiede im Adrenalin-Noradrenalingehalt der vasomotorischen Nerven dieser Region zurückgeführt werden können (1954). Weiter fanden Weil-Malherbe u. Renton Zusammenhänge zwischen massiven elektrischen Reizen, wie sie im Elektroschock auftreten, und dem Blutgehalt an Katecholaminen und zwischen geistiger Aktivitätund Plasmaadrenalin (Weil Malherbe, 1955; Renton u. Weil-Malherbe, 1956).

Es ist bekannt, daß bei Sympathicusreizung das Nebennierenmark Adrenalin und Noradrenalin (Bülbring u. Burn, 1949), verschiedene postganglionäre sympathische Endigungen Noradrenalin freisetzen (Peart, 1949). Sucht man nach Zuständen, wo größere Veränderungen im Blutkatecholamingehalt erwartet werden können, dürften diese somit bei den großen Aktivitätsänderungen der sympathischen Erregungsübertragungen zu finden sein. Im pathologischen Rahmen sind solche beim Phaeochromocytom, physiologisch bei großen körperlichen Anstrengungen im Sinne vermehrter Ausschüttung der Katecholamine, experimentell durch bestimmte Pharmaka, wie z. B. hohe Dosen von Reserpin im entgegengesetzten Sinne zu erwarten. Im Arbeitsversuch erkennt man die hohe Katecholaminfreisetzung an der Blutdruckerhöhung und am Blutzuckeranstieg, beim Phaeochromocytom an der Wirkung auf den Blutdruck. Beim Reserpin wird der blutdrucksenkende Effekt ergänzt durch eine sedativ-hypnotische Wirkung, Miosis und den Nickhautvorfall bei der Katze, was auf einen Zusammenhang mit dem zentralen Sympathicus schließen läßt. Daß daneben eventuell noch ein peripherer Angriffspunkt in Erwägung gezogen werden muß, zeigen Befunde von Carlsson u. Hillarp (1956), die trotz Splanchnicusdurchtrennung unter Reserpin eine völlige Adrenalinentleerung des Kaninchennebennierenmarkes erhielten. Inwiefern diese Resultate auf sehr

hohe Dosen zurückzuführen sind, da Holzbauer u. Vogt mit relativ kleinen Mengen am splanchnicusdurchtrennten Tier keinen Adrenalinabfall nachweisen konnten (1956), wissen wir nicht.

Brodies Arbeitsgruppe fand nach Reserpin eine Verminderung der Speicherkapazität von 5-Hydroxytryptamin in Blutplättchen, Darm- und Hirnzellen (Pletscher, Shore u. Brodie 1955, Brodie, Pletscher u. Shore 1955). Da sich Synthese, Speicherung und Abbau von 5-Hydroxytryptamin in vieler Hinsicht gleich verhalten wie die von Adrenalin und Noradrenalin, war es von besonderem Interesse zu prüfen, ob das Reserpin auch auf die Adrenalin- und Noradrenalinkonzentration im Plasma einen Einfluß ausübt.

Nachdem unsere Versuche abgeschlossen waren, zeigten nun vor kurzem Carlsson u. Hillarp (1956) nach Reserpin eine deutliche Adrenalinverarmung des fast ausschließlich Adrenalin enthaltenden Kaninchennebennierenmarkes bei intaktem Splanchnicus. Ungefähr zur selben Zeit wiesen Holzbauer u. Vogt (1956) an Extrakten von Hirnteilen eine Noradrenalinabnahme nach Reserpin nach.

Methode und Versuchsanordnung

Im Prinzip wurde die fluorometrische Bestimmungsmethode von Weil-Malherbe u. Bone (1952) unter Anbringung einiger Modifikationen verwendet. (Vgl. Kägi, Burger u. Giger vorstehend S. 470.)

Die Frage nach der Spezifität dieser Bestimmungsmethode, der Reproduzierbarkeit und Ausbeute von zugesetzten Katecholaminen und anderen Stoffen wurde von Weil-Malherbe u. Bone weitgehend abgeklärt (1953 und 1954). Unsere Untersuchungen ergaben hinsichtlich Spezifität der Methode unter anderem eine Elimination des 5-Hydroxytryptamins bei der Adsorption der Katecholamine.

Die Adrenalin-, Noradrenalinbestimmungen wurden an Patienten der psychiatrischen Universitätsklinik Zürich (Direktor: Prof. M. Bleuler), die unter Reserpintherapie (Serpasil) standen, durchgeführt. Dazu kam ein einzelner Fall mit Chlorpromazin (Largactil). Serpasil wurde meist peroral appliziert. Nur, wenn die Wirkung kurz nach Verabreichung des Medikaments zu untersuchen war (Tab. Fall 4 und 5) kam das Pharmakon i.v. oder i.m. zur Verwendung. Wurde dieselbe Dosis dem gleichen Patienten i.v. und peroral verabreicht, ergab sich weder subjektiv noch objektiv ein Unterschied in der Wirkung. Parallel mit der Adrenalin-, Noradrenalinbestimmung wurden Blutdruck, Puls und der psychische Zustand des Patienten kontrolliert. Durch zeitliche Variation der Versuchsanordnung war es möglich, den Wirkungsverlauf des Serpasils am Patienten genauer abzuklären. Dies geschah zum Teil durch Variierung der Entnahmezeiten während der Serpasilwirkung, zum Teil warteten wir mehrere Tage nach Absetzen der Medikation mit der Blutentnahme, um festzustellen, wann die Ausgangswerte im Blutplasma wieder erreicht werden. Außerdem arbeiteten wir mit verschiedenen Dosen. Mit der peinlich genauen Standardisierung der Blutentnahmen, der Versuchszeiten, der Plasmabehandlung usw. hofften wir Fehlerquellen so weitgehend wie möglich zu eliminieren.

Zur Verfügung standen uns eine homogene und eine mehr heterogene Patientengruppe, wobei innerhalb dieser Gruppe sowohl psychiatrisch leichte wie schwerste Fälle zur Untersuchung gelangten. Als einigermaßen homogen dürfte eine Gruppe psychiatrischer Patienten mit fast ausschließlich seniler Demenz betrachtet werden, die alle 60 Jahre und älter

waren. Daneben wurden aber auch jüngere Patienten unter 30 Jahren, die keine Hypertonien oder psychischen Erkrankungen aufwiesen, aber unter Serpasilwirkung standen, vergleichsweise untersucht. Wir achteten darauf, daß keine Patienten mit endokrinen Störungen in die Untersuchungen einbezogen wurden. Zur Sicherung der Resultate untersuchten wir auch noch eine Gruppe von Hypertonikern der medizinischen Universitätspoliklinik Zürich (Direktor: Prof. Dr. P. H. Rossier), die mit Serpasil behandelt wurden.

Resultate

Reserpin. Wegen der Besonderheit ihres psychischen Zustandes (Dauererregung, welche geeignet wäre, das Katecholaminbild im Blut zu verändern) wurden vorerst 2 Schizophreniefälle getrennt behandelt (Tab.: Fall 1 und 2). Die Manifestation des Schubes war bei beiden etwa gleich intensiv. Beide Patienten zeigten unter Reserpin einen deutlichen Noradrenalinabfall. Der eine hatte einen niederen Ausgangsblutdruck, der andere eine Hypertonie. Der jüngere, dessen Blutdruckabfall entsprechend der normotonen Ausgangslage geringer war und dessen Pulsfrequenz gleich blieb, zeigte neben der deutlichen Noradrenalinabnahme einen Adrenalinanstieg im Unterschied zu Blutdruck-, Puls- und Adrenalinabfall des Hypertonikers. Diese Beziehung zwischen Adrenalinabfall im Blut und Senkung des Blutdruckes konnte wiederholt festgestellt werden. Entsprechend den hohen Reserpindosen, die in den beiden Fällen appliziert wurden, fanden wir auch hier stärksten Noradrenalinabfall. Infolge der hohen Dosierung wies der ältere Patient ziemlich deutliche Parkinsonsymptome wie Tremor, Rigor und Salivation auf.

Bei den folgenden 10 Patienten, 5 Frauen und 5 Männern der homogenen Gruppe (senile Demenz), wurde die Reserpintherapie schematisch genau gleich durchgeführt, wodurch es möglich war, die Blutentnahmen und Katecholaminbestimmungen in exakt standardisierter Weise auszuführen. Nach einer 3tägigen Kur mit 6 (bis 8,5) mg Reserpin per os pro Tag fiel bei dieser Patientengruppe der Plasmanoradrenalingehalt um mehr als 60% ab, während der Adrenalingehalt nur um 10% sank. Die letzten Blutproben wurden 9 Tage nach Absetzen der Medikation entnommen. Sie ergaben einen Anstieg der Noradrenalinkonzentration, der im Streubereich des Ausgangswertes lag (Abb. 1).

Klinisch zeigten die Patienten allgemein eine Beruhigung, die sich in erhöhtem Schlafbedürfnis, nie aber in Dauerschlaf- oder Stuporzuständen manifestierte. Bei einzelnen trat die Beruhigung erst 36—48 Std nach Behandlungsbeginn ein. Der Beruhigung ging in diesen Fällen eine Irritationsphase voraus, in welcher sich ausgeprägter Betätigungsdrang und Schwatzhaftigkeit geltend machten. Gerade diese Patienten wiesen entweder einen Adrenalinanstieg, gleichhohe Adrenalinwerte oder einen

minimalen Adrenalinabfall auf. Bei allen anderen war der Adrenalinabfall deutlicher. Es fand sich aber auch bei dieser Gruppe nach Eintritt der Beruhigung ein intensiver Noradrenalinabfall. Bei 4 Patienten, deren Adrenalinwert anstieg oder gleich blieb, jedenfalls nicht abfiel, stieg der Blutdruck an oder blieb etwa auf der Ausgangslage trotz des großen Noradrenalinabfalles; bei allen anderen fiel er durchschnittlich um 40 mm Hg systolisch ab. Sofort nach Absetzen der Therapie normalisierten sich die Blutdruckwerte, während bei einzelnen Patienten, die

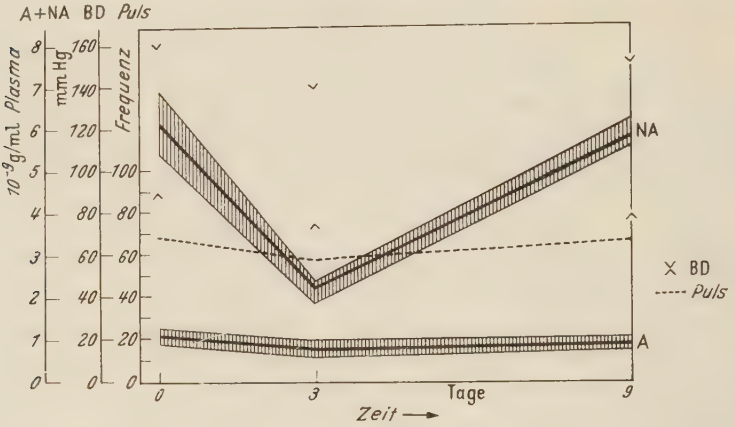


Abb. 1. Mittelwerte von Adrenalin und Noradrenalin im Blutplasma, Blutdruck und Puls von 10 Patienten vor, während und nach einer Reserpinkur von 3 Tagen

einen Adrenalinabfall gezeigt hatten, dieser auf tieferem Niveau erhalten blieb. Der Puls zeigte keinen mit dem Verhalten des Adrenalins parallelen Verlauf, indem bei allen Patienten die Pulsfrequenz mehr oder weniger stark abfiel.

Da diese 10 Fälle mit beinahe gleichen Dosen behandelt und die Blutentnahmen jeweils in derselben Therapiephase erfolgten, durfte eine Gruppenstatistik unternommen werden:

Das berechnete t liegt beim Adrenalin mit 1,74 innerhalb der Sicherheitsgrenze von 2,10, wenn p als 0,05 angenommen wird. Somit ist der durchschnittliche Adrenalinabfall rein zufällig. Das t des Noradrenalins dagegen ist bei strenger Betrachtung ($p = 0{,}001$) mit 8,45 weit über der Sicherheitsgrenze von 3,92, womit der Noradrenalinabfall deutlich signifikant ist (Linder, 1951).

Im weiteren untersuchten wir an 3 Patienten mit verschiedenen Krankheiten den zeitlichen Verlauf der Katecholaminveränderungen nach einmaliger Reserpinapplikation unter Variation der Dosis. Der Noradrenalinabfall, der wieder bei allen 3 Patienten vorhanden war, begann schon 20 min nach Applikation von 5 mg Reserpin, begleitet und gefolgt von einem Blutdruckabfall von 25—35 mm Hg. Nach 2,5 mg Reserpin trat der Noradrenalinabfall erst nach 90 min ein, und die Wirkung auf den

Tabelle 1. *Verlauf der Adrenalin- und Noradrenalinkonzentration im Blutplasma, Blutdruck und Puls von 6 verschiedenartig mit Reserpin oder Chlorpromazin behandelten Patienten*

Patient	Klin. Diagnose	Reserpin Tagesdosis	Dosis bis zur entsprechenden Zeit	NA 10 ^{9} g/ml Plasma	A	BD mm Hg	Pulsfrequenz	Bemerkungen
1. ♂ 28	Schizophrenie	10 mg	0	2,55	0,58	125/65	72	ängstlich
			55 Std 20 mg	1,43	0,98	110/55	72	Angst verschwunden
2. ♂ 40	Schizophrenie	10 mg	0	6,09	0,59	190/110	76	völlig ruhig
			96 Std 30 mg	2,64	0,45	165/90	64	parkinsonähnliche Erscheinungen
3. ♂ 49	Pleuritis	einmalige Dosis	0	5,03	0,61	120/80	76	
			30 min 5 mg	2,53	0,15	115/80	76	frontales Kopfweh, injizierte Skleren, „flush“
			90 min	2,01	0,10	95/55	74	idem
			7 Std	1,75	0,16	110/60	64	frontales Kopfweh abnehmend, „flush“ verschwunden
			24 Std	1,91	0,32	110/65	68	front. Kopfweh verschwunden, Skleren schwach injiziert
			48 Std	8,32	0,24	120/75	68	Skleren rein
4. ♀ 55	nicht abgeklärt	einmalige Dosis	0	5,60	0,29	155/90	76	ruhig, sehr sensibel
			72 min 5 mg	4,30	1,89	120/65	76	„flush“, kalte Beine
5. ♂ 40	vegetative Neurose	einmalige Dosis	0	3,85	0,11	105/65	70	
			30 min 2,5 mg	3,69	0,17	110/70	78	gerötetes Gesicht, Tremor
			90 min	3,09	0,85	120/65	84	Rigor, Rötung verschwunden
			15 Std	4,00	0,09	120/60	66	
6. ♀ 34	vegetative Neurose	Chlorpromazin 400 mg	0	3,80	0,31	135/80	80	Kopfschm., geröt. Gesicht
			100 min 100 mg	3,52	0,20	135/80	80	Herzkl., andere Symptome verschwunden
			25 Std 400 mg	1,44	0,13	135/80	100	schläfrig

Blutdruck blieb überhaupt aus. Im allgemeinen kam es zum Blutdruckabfall meist erst, nachdem der Noradrenalinabfall und die Veränderungen im Adrenalinwert deutlich geworden waren. Bei den meisten mit höheren Dosen behandelten Patienten sank er sogar erst nachdem das Noradrenalin schon längst abgefallen war.

Die beiden letztuntersuchten Patienten (Tab.: Fall 5 und 6) schienen äußerlich sehr ruhig, zeigten aber Einschlaf- und periphere Durchblutungsstörungen; wie früher fanden wir auch bei diesen vegetativen Dystonikern nach Reserpin einen Adrenalinanstieg.

Im ganzen zeigen unsere Untersuchungen, daß der Noradrenalinabfall nicht nur je nach Dosis rascher oder langsamer eintritt, sondern, daß auch die Normalisierung auf den Ausgangswert von der Dosis abhängt: dieser wurde bei 2,5 mg schon nach 15 Std, bei 5 mg erst nach 24 Std wieder erreicht. Subjektiv traten nach einer einmalig verabreichten hohen Dosis von 5 mg die für Reserpin anscheinend typischen Symptome auf wie: „flush", der in mancher Hinsicht an den 5-Hydroxytryptamin-„flush" bei metastasierendem Dünndarmkarzinoid erinnert; ferner injizierte Skleren und kalte Unterextremitäten.

Die ausführliche Beschreibung eines charakteristischen Reserpinfalles ist in folgendem wiedergegeben.

Ein 49jähriger Vagotoniker mit einem Blutdruck von 120/80 und einem Puls von 76 erhielt 5 mg Reserpin (Serpasil) i.v. Nach 20 min zeigte er trotz gleich gebliebenem Blutdruck und Puls stark injizierte Skleren und klagte über frontales Kopfweh. Das Adrenalin sank von 0,61 ng/ml[1] Plasma um 25%, das Noradrenalin von 5,0 ng um 50%; nach 90 min verstärkte sich die Injektion der Skleren, und der Blutdruck sank nun parallel mit einem langsam eintretenden „flush" um 1/4 auf 95/55 mm Hg, während der Puls gleich blieb. Adrenalin und Noradrenalin fielen nochmals um 1/3 resp. 1/5 auf 0,1 ng und 0,2 ng. Nach 7 Std verschwanden Kopfweh und „flush" zusammen mit der Normalisierung des Blutdruckes. Das Noradrenalin sank nochmals ein wenig auf den tiefsten Wert von 1,8 ng, während das Adrenalin wieder auf 0,16 ng zu steigen begann. Nach 24 Std waren Adrenalin auf die Hälfte, Noradrenalin auf 2/5 angestiegen; nach 48 Std lagen Adrenalin- auf 1/3, Noradrenalinwert auf mehr als 3/2 des Ausgangswertes. Der Noradrenalinwert scheint sich also zwischen dem 2. und 3. Tag, der Adrenalinwert auch dann noch nicht erholt zu haben, ganz unabhängig von den klinischen Symptomen des Patienten, die schon nach 7 Std, also viel früher verschwunden waren (Abb. 2).

Chlorpromazin. Um uns darüber Rechenschaft zu geben, ob es sich bei der Senkung des Noradrenalingehaltes im Blutplasma um eine spezifische Reserpinwirkung handle, wurde neben den Reserpinkuren eine Chlorpromazinkur untersucht.

Bei dem betreffenden Patienten veränderten sich 90 min nach 100 mg Chlorpromazin, was etwa in der therapeutischen Wertigkeit einer Reserpindosis von 2 mg liegt (siehe oben), im Unterschied zum Reserpin weder Blutdruck noch Puls. Trotzdem verschwanden ähnlich wie nach

[1] ng = 10^{-9} g.

Reserpin fast alle subjektiven Symptome, wie Kopfweh, Schwindel und Flimmern vor den Augen, und es trat psychisch eine weitgehende Entspannung ein. Parallel damit waren die Katecholaminwerte im Blutplasma nur wenig verändert; vor allem fehlte die eindeutige Noradrenalinabnahme, die beim Reserpin schon nach 90 min ausgeprägt war. 24 Std nach total 400 mg Chlorpromazin trat die für das Pharmakon typische

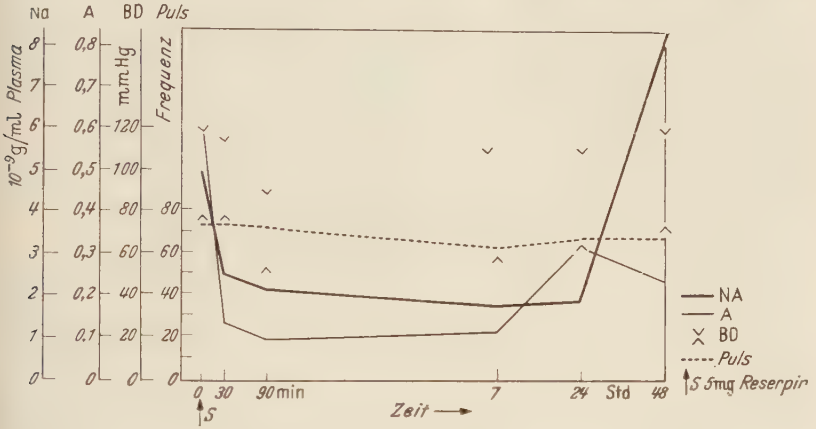


Abb. 2. Verlauf von Adrenalin und Noradrenalin im Blutplasma, Blutdruck und Puls eines mit einer einmaligen Reserpindosis behandelten Patienten

Tachykardie ein, zusammen mit einem deutlichen Adrenalinabfall, was geradezu paradox erscheint.

Weil-Malherbe (1955) hat an 3 Patienten, die mit ähnlichen Dosen Chlorpromazin behandelt worden waren, Adrenalin und Noradrenalin im Blutplasma untersucht. Daß er für beide Amine keine deutlichen Veränderungen fand, dürfte vielleicht darauf zurückzuführen sein, daß er den Versuch zu früh abbrach, da bei unserem Patienten außer dem Adrenalinabfall auch der Abfall der Noradrenalinkonzentration erst nach 24 Std ausgeprägt in Erscheinung trat.

Diskussion

Die Abklärung der Frage nach der Spezifität der Untersuchungsmethode von Weil-Malherbe muß bei jeder Diskussion der Resultate in den Vordergrund gerückt werden. Dies gilt in ganz besonderem Maße für Versuche mit Reserpin, da zunächst dessen Wirkung auf die Hemmung der Speicherung des 5-Hydroxytryptamins festgestellt wurde (Brodie u. Mitarb. 1955), so daß auch in unseren Versuchen vielleicht in erster Linie Veränderungen im Plasmagehalt dieses Amins und nicht des Noradrenalins zu erwarten gewesen wären. Diese Fehlerquelle ist aber durch die Methodik selbst ausgeschaltet.

Außerdem könnte ein anderes Amin, das Dopamin (Hydroxytyramin) mit der Weil-Malherbe-Methode mitgemessen werden. Nach Weil-Malherbe (1952) ist

jedoch dieser Vorläufer des Noradrenalins im Blut beim Menschen nicht zu finden. Ebenso enthält die menschliche Nebenniere kein Dopamin (Shepherd u. West, 1953). Trotzdem haben verschiedene Autoren Dopamin im Urin und zum Teil in tierischen Organen nachgewiesen (Holtz et al., 1942; Goodall, 1951; Shepherd u. West, 1953 und Schümann, 1956). Gegen eine irgendwie maßgebliche Beteiligung von Dopamin an der Konzentrationsabnahme der Katecholamine bei den Reserpinversuchen spricht aber die Veränderung der Fluorescenzcharakteristik (Wellenlänge), die sich mit derjenigen des Noradrenalins und nicht mit derjenigen des Dopamins deckt.

Fehlerquellen könnten auch in der klinischen Versuchsanordnung liegen. So könnte der Konzentrationsabfall der Katecholamine, insbesondere des Noradrenalins, zum Teil durch den Umstand bedingt sein, daß die Patienten der Reserpinkur wegen ins Bett gelegt wurden und dann ausgiebig schliefen. Dagegen spricht jedoch, daß alle Patienten, auch jene, welche schon vorher bettlägerig waren, nach Reserpin einen Noradrenalinabfall aufwiesen, der gleich hoch war wie bei den anderen Patienten. Weiter spricht dagegen, daß am schlafenden Menschen ein Adrenalinabfall, aber keine Veränderung des Noradrenalins gefunden wurde, dieser somit nicht durch den Schlaf bedingt sein kann (Renton u. Weil-Malherbe, 1956).

Die bei verschiedenen Patienten nach Reserpin auftretenden Parkinsonanzeichen zeigten keine absolute Abhängigkeit von der Reserpindosis. Bei den beiden Schizophreniepatienten (Tabelle: Fall 1 und 2) traten beim einen mit derselben Dosis von 10 mg pro Tag Parkinsonsymptome auf, beim andern nicht. Ein anderer Patient zeigte nach einer einmaligen Dosis von nur 2,5 mg Tremor und Rigor. Da auch zwischen Blutdruck, Puls und Parkinsonsymptomen kein deutlicher Parallelismus nachgewiesen werden konnte, scheint es sich eher um eine individuelle Bereitschaft zum Parkinsonismus zu handeln. Im Zusammenhang damit könnte eine vegetativ-dystonische Ausgangslage stehen, da gerade jene Patienten, die mit Tremor, Rigor und Salivation auf Reserpin reagierten, eine mehr oder weniger ausgeprägt vegetative Dystonie zu Beginn der Therapie zeigten (Cardiovasculäre Störungen, Verdauungs- und Miktionsstörungen).

Der Adrenalinabfall bei gleichzeitiger Tachykardie nach Chlorpromazin erscheint paradox. In unserer Versuchsreihe sind aber Puls-, teilweise auch Blutdruckveränderungen, die den Wirkungen, die auf Grund der Katecholaminverschiebungen zu erwarten wären, nicht entsprechen, gar nicht selten, so daß wir kleineren Adrenalin-Noradrenalinschwankungen überhaupt keine Bedeutung für den Puls zumessen möchten. Erst große Verschiebungen, wie sie bei Noradrenalininfusionen (z. B. nach Phaeochromocytomexstirpation) vorkommen, zeigen dann die diesem Amin entsprechenden Kreislaufveränderungen.

Reserpin hat seinen wichtigsten Angriffspunkt am Zentralnervensystem (Bein, Gross, Tripod u. Meier, 1953). Bente et al. (1955) und Rinaldi (1955) sind der Auffassung, daß Reserpin an der substantia reticularis des Zwischenhirns angreift. M. Vogt hat am Hund die gleiche Gegend als reich an „Sympathin" bezeichnet, wobei das Noradrenalin den weitaus größten Teil dieses „Sympathins" ausmacht (1954). Ganz in diesen Rahmen paßt der oben erwähnte Befund einer Verarmung an Noradrenalin im Hirn nach Reserpin (M. Vogt, 1956). Dazu kommt der gleichfalls oben beschriebene Befund Carlssons u. Hillarps (1956).

Der Noradrenalinabnahme im menschlichen Plasma scheint allgemeine Bedeutung zuzukommen, besonders da sie schon nach kleinen Reserpindosen eintritt, während die beim Tier am Zentralnervensystem festgestellten Noradrenalinabnahmen erst mit 6—75mal höheren Dosen erreicht wurden.

Man kann an diese Befunde vielleicht folgende Überlegungen zur Erklärung des Reserpinwirkungsmechanismus anschließen:

1. Es könnte durch Reserpin die Bildung oder Freisetzung des Noradrenalins im Gehirn oder Blut gehemmt werden. Trotzdem eine Abnahme der Aminosäuredecarboxylaseaktivität nach Reserpin nicht nachweisbar ist (Kuntzmann et al., 1956), wäre dies eventuell möglich, da die Noradrenalinsynthese auch über andere Wege gehen könnte und, da beim Weg über die Decarboxylierung immer noch nichts über die Oxydierungsstufe des β-C-atoms ausgesagt wäre. Sofern Noradrenalin nicht über Dioxyphenylserin entstehen kann, würde diese Oxydierung die letzte Stufe vor der Bildung des Noradrenalins darstellen. Somit müßte man diese bis heute unbekannte „Dopaminoxydase" untersuchen, um eine Aussage über die Bildung von Noradrenalin machen zu können.

2. Es könnte der Abbau des Noradrenalins unter dem Einfluß des Reserpins am Bildungsort gesteigert sein, was mit Aminoxydase- und Phenoloxydasebestimmungen allenfalls zu untersuchen wäre. Es scheinen allerdings bis heute noch keine Stoffe bekannt zu sein, welche zu einer Aktivierung dieser Fermente geführt haben.

3. Bei eintretenden Methylierungsstörungen könnte das Verhältnis Adrenalin/Noradrenalin gegen die Adrenalinseite verschoben werden, wodurch das demethylierte Noradrenalin abnimmt.

4. Es könnte die Speicherkapazität in Blut und Gehirn unter Reserpin für Noradrenalin abnehmen, was auch beim 5-Hydroxytryptamin unter Reserpinwirkung vermutet wird. Es müßte dann, wenn Bildung und Abbau am Entstehungsort gleich bleiben sollten, entsprechend der Vorstellung von Holtz (1942) über die Adrenalingenese, eine Vorstufe des Noradrenalins produziert werden, zum Teil an den Speicher innerhalb der Zelle gehen und erst dort zu Noradrenalin werden. Die überschüssige Vorstufe würde die Zelle verlassen. Bei Verminderung der Speicherung könnte die gleich intensiv gebildete Vorstufe vermehrt, das Noradrenalin aus dem Speicher aber vermindert abgegeben werden.

Zusammenfassung

Die Blutkatecholamine Adrenalin und Noradrenalin wurden nach einer fluorometrischen Methode an Patienten, die unter Reserpintherapie standen, bestimmt.

Unter Variation der Versuchsanordnung und Reserpindosis fand sich in allen Fällen eine durchschnittliche Abnahme des Plasmanoradrenalins um 50%. Der ebenfalls meist eintretende Adrenalinabfall war nicht signifikant.

Für die Überlassung von L-Adrenalin (Base) und L-Noradrenalin-HCl danke ich den Farbwerken Hoechst (Werkvertretung: Plüß-Stauffer AG., Oftringen).

Literatur

Bente, D., u. T. Itil: Med. Klin. **1955**, 1296. — Bein, H. J., F. Gross, J. Tripod u. R. Meier: Schweiz. med. Wschr. **1953**, 1007. — Brodie, B. B., A. Pletscher and P. A. Shore: Science (Lancaster, Pa.) **12**, 968 (1955). — Bülbring, E., and J. H. Burn: Brit. J. Pharmacol. **4**, 202 (1949). — Burger, M.: Helvet. physiol. Acta **14**, C 13 (1956). — Carlsson, A., u. N.-A. Hillarp: Kgl. Fysiogr. Sällsk. Hdl. **26**, 8 (1956). — Crawford, T. B. B., and A. S. Outschoorn: Brit. J. Pharmacol. **6**, 8 (1951). — Diethelm, O., M. F. Fleetwood and A. T. Milhorat: A. Res. Nerv. Ment. Dis. Proc. **29**, (Williams und Wilkins, Baltimore

1950). — Funkenstein, D. H., M. Greenblatt and H. C. Solomon: Amer. J. Psychiatr. **108**, 652 (1952). — Goodall, McC.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **24**, suppl. **85** (1951). — Holtz, P., K. Credner u. W. Koepp: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 356 (1942). — Holzbauer, M., u. M. Vogt: J. Neurochem. **1**, 8 (1956). — Kägi, J., M. Burger, K. Giger: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **230**, 470 (1957). — Kuntzmann, R., S. Udenfriend, E. G. Tomwich, B. B. Brodie and P. A. Shore: Federat. Proc. **15**, 450 (1956). — Linder, A.: Statistische Methoden. Basel: Birkhäuser 1951. — Lund, A.: Acta pharmacol. (Copenh.) **5**, 231 (1949). — Peart, W. S.: J. of Physiol. **108**, 491 (1949). — Pletscher, A., P. A. Shore and B. B. Brodie: Science (Lancaster, Pa.) **122**, 374 (1955). — Renton, G. H., and H. Weil-Malherbe: J. of Physiol. **131**, 170 (1956). — Rinaldi, F., and H. E. Himwich: Ann. New York Acad. Sci. **61**, 27 (1955). — Schümann, H. J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 566 (1956). — Shepherd, D. M., and G. B. West: J. of Physiol. **120**, 15 (1953). — Vogt, M.: J. of Physiol. **123**, 451 (1954). — Weil-Malherbe, H.: J. Ment. Sci. **101**, 156 (1955); **101**, 733 (1955a). — Weil-Malherbe, H., and A. D. Bone: Biochemic. J. **51**, 311 (1952). — Lancet **1**, 974 (1953). — Biochemic. J. **58**, 132 (1954).

Dr. H. Langemann, Pharmakologisches Institut der Univ. Zürich/Schweiz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 499—501 (1957)

Institut für Pharmakologie und experimentelle Therapie der Universität Bologna
(Direktor: Prof. A. Cestari)

Über die Wirkung von Vitamin B_{12} und die Krebserzeugung durch Buttergelb

Von
Pietro Dessi

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 13. Februar 1957)

Es ist bekannt, daß die krebsbildende Wirkung von Buttergelb bedeutende quantitative Veränderungen erleidet, die hauptsächlich mit einer Vitaminanreicherung der Diät in Zusammenhang stehen.

Während Riboflavin das Auftreten von Hepatomen[3] retardierend beeinflußt, und deren statistisches Vorkommen einschränkt, ruft Biotin und B_{12} in der Krebsbildung durch Buttergelb eine frühzeitige Entwicklung und eine starke Vermehrung der Anzahl von Hepatomen[6] hervor.

Day u. Mitarb.[2] konnten feststellen daß bei Rattengruppen, deren Diät 70 mg-% Buttergelb zugefügt war, das Vorkommen von Hepatomen in 170 Tagen von 17% auf 78% anstieg, wenn die Diät mit 5 mg-% Vitamin B_{12}versetzt wurde, während es bei einer Diät mit Zusatz von 6% Methionin auf 11% fiel und bei einer Diät mit Beimischung von beiden Substanzen 33% betrug.

Durch diese Versuche wurde erwiesen, was später noch durch Miller u. Mitarb.[4] auf breiterer Basis bestätigt wurde, daß B_{12} die karzinogene Wirkung von Buttergelb erhöht, während sie Methionin stark antagonistisch beeinflußt. Unklar bleibt jedoch der Mechanismus, mit welchem das Vitamin auf die Krebsentwicklung einwirkt. Die genannten Forscher denken, daß es sich wie ein Vergrößerungsfaktor des Tumors verhält oder daß es die durch das Karzinogen erzeugten metabolischen Veränderungen beeinflußt. Die erwähnten Versuche von Miller u. Mitarb., bei denen Tiere unter verschiedenen diätetischen Bedingungen markiertes Buttergelb verabreicht wurde, haben gezeigt, daß bei Fehlen von Vitamin B_{12} die Einverleibung des von metabolischen Gruppen des Karzinogens herstammenden C^{14} in das Lebercholin reduziert ist. Dieses Phänomen gibt jedoch keine Erklärung für die starke Zunahme an durch B_{12} hervorgerufenen Hepatomen.

Der Stoffwechsel des durch lang fortgesetzte Einnahme von Buttergelb neoplastisch gewordenen Lebergewebes wurde besonders von Burk[1] studiert und zu dem des regenerierenden Lebergewebes in Beziehung gesetzt. Normale Zellen, wie auch Regenerationszellen erzeugen im Gasraum negativen Druck, während Leberzellen von Ratten, die einer längeren Behandlung mit Buttergelb unterworfen waren, einen positiven Druck erzeugen und damit eine Erhöhung der Glykolyse aufzeigen, die mit der Behandlungszeit in quantitativem Zusammenhang steht; d. h. die Respiration verringert sich im Verlauf der Krebsentwicklung mit der progressiven Tendenz, sich dem für Tumore charakteristischen Umsatztypus anzunähern, bei dem sie dann ständig verbleibt.

Aufgabe vorliegender Untersuchungen war es, das respirometrische Verhalten des präneoplastischen Lebergewebes unter dem kombinierten Einfluß des krebserzeugenden Stoffes und des Vitamins zu studieren, um festzustellen, ob und in welchem Umfang es die Fähigkeit hat, die Gewebsatmung stärker und bis zur Inversion zu verringern, schneller also, als es bei bloßer Zufuhr des krebsbildenden Wirkstoffes allein geschehen würde.

Methodik

Die Versuche wurden an 24 gleichgenährten erwachsenen männlichen Albinoratten mit einem Gewicht von 145 ± 8 g, ausgeführt, in deren Nahrung Buttergelb in einer Menge von 70 mg-% gemischt wurde.

Der Hälfte der Tiere wurde täglich Vitamin B_{12} in einer Menge von 10 mg per os verabreicht. Je 4 Ratten der allein mit Buttergelb behandelten Gruppe und 4 von der Gruppe, die außerdem Vitamin erhielten, wurden am 60. und am 90. Tage des Versuches geopfert: am 120. Tage erlaubte die überlebende Zahl der behandelten Tiere die Ausführung der respirometrischen Feststellungen nur an zwei Ratten der mit Buttergelb plus Vitamin B_{12} und an drei Ratten der nur mit dem Karzinogen behandelten Gruppe.

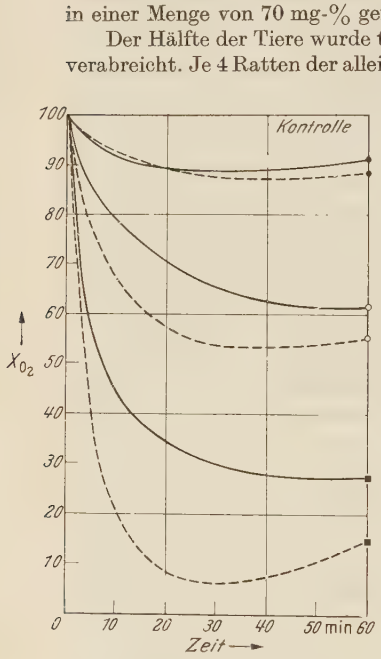


Abb. 1. Wirkungen der Kombination von Buttergelb und B_{12} auf die hepatische Gewebeatmung bei verschiedener Behandlungsdauer. (Die gestrichelte Linie bezieht sich auf die Vitaminzugabe (• Nach 60 Tagen, ○ nach 90 Tagen, ▪ nach 120 Tagen)

Die manometrischen Messungen wurden nach Angaben von UMBREIT u. Mitarb.[5] an Gewebsbrei in Pufferlösung vorgenommen, wobei kegelförmige, mit einem Zentraleinsatz versehene Gefäße verwendet wurden.

Die Ablesungen erfolgten nach Temperaturausgleich in regelmäßigen Abständen von je 10 min während einer Stunde.

Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in beigefügtem Diagramm zusammengefaßt, wobei auf der Abszisse die Versuchsdauer in Minuten angegeben ist, während die Ordinaten die hepatische Gewebsatmung je Gramm Gewebe in Prozenten der Atmungstätigkeit der normalen Leber ausdrücken.

Die hepatische Gewebsatmung der mit Buttergelb behandelten Tiere ist gegenüber den Kontrolltieren in allen Fällen geringer. Die Verringerung geht parallel der Behandlungszeit: sie erreicht 10% nach 60 Tagen, 30—40% nach 90 Tagen und 70% nach 120 Tagen der Karzinogenverabreichung.

Zweitens konnte festgestellt werden, daß die Gewebsatmung bei Tieren, nach dem Karzinogen plus B_{12} gegenüber den während der gleichen Zeitdauer mit bloßem Karzinogen behandelten Tieren stets noch

wesentlich niedriger ist. Die Wirkung von B_{12} auf die Atmung präkankrösen Gewebes setzt langsam und erst mit der Zeit ein: in der Tat ist am 60. Tage der Atmung der mit Vitamin behandelten Tiere die gleiche wie die der nicht mit Vitamin behandelten, während am 90. Tage Differenzen von 12% beobachtet werden können, die am 120. Tage ansehnlich werden und zwischen 20 und 25% schwanken.

Das durch die Untersuchungsergebnisse aufgeworfene Problem besteht darin, wie und in welchem Stadium des intermediären Stoffwechsels sich die die Krebsbildung begünstigende Wirkung von Vitamin B_{12} entfaltet.

Zusammenfassung

Der Verf. untersuchte die hepatische Gewebeatmung bei Ratten unter Behandlung mit Buttergelb und Vitamin B_{12}. Dabei wurde nachgewiesen, daß Vitamin B_{12} die schon durch Buttergelb veränderte Atmungstätigkeit des präneoplastischen Lebergewebes noch bis zu 35% weiter progressiv senkt.

Literatur

[1] Burk, D.: Symposium on Respiratory Enzimes p. 235. Univ. of Wisconsin Press., Wisconsin 1942. — [2] Day, P. L., Lou Dewees Payne and J. S. Dinning: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **74**, 854 (1950). — [3] Kensler, C. J.: Science (Lancaster, Pa.) **93**, 308 (1941). — [4] Miller, J., and E. Miller: Cancer Res. **12**, 283 (1952). — [5] Umbreit, W. W., R. H. Burris and J. F. Stauffer: Manometric Techniques and Tissue Metabolism, Burgess Publ. Co. 1951. — [6] du Vigneaud, V.: Science (Lancaster, Pa.) **95**, 174 (1942).

Dr. Pietro Dessi, Institut f. Pharmakologie und experimentelle Therapie der Univ. Bologna (Italien)

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 502—512 (1957)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg/Br.
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. L. Heilmeyer)

Zur Beeinflussung des Eisenstoffwechsels durch Hormone, Vitamine und reduzierende Substanzen

Von
F. Wöhler und M. Körte

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. März 1957)

Untersuchungen des Plasmaeisens beim Menschen lassen unter den Einwirkung verschiedener Hormone und Vitamine bestimmte gesetzmäßige Veränderungen erkennen, die auf die Wichtigkeit dieser Stoffe für das Geschehen im Eisenstoffwechsel hinweisen. So wurde unter ACTH und Cortison beim Menschen und im Tierversuch auch unter DOCA eine Senkung des Serumeisenspiegels gefunden (W. Beiglböck u. Mitarb.; G. E. Cartwright u. Mitarb.; K. H. Schäfer u. J. Boenecke; H. Braunsteiner u. Mitarb.; A. Aschkenasy u. E. Renier; P. Larizza u. Mitarb. u. a.).

Weniger eindeutig waren die Ergebnisse bei Hyperthyreosen. Ein Teil der Untersucher fand leicht erhöhte, andere wieder erniedrigte Serumeisenwerte. Untersuchungen mit Fe^{59}-Globulin lassen jedoch keinen Zweifel daran, daß nach Thyroxin-Gabe ein beschleunigter Eisenabstrom aus dem Blutplasma eintritt (W. Keiderlidng, H. A. E. Schmidt u. M. Lee).

Durch die Arbeiten von W. Neuweiler sowie von W. Stich u. H. Wolff wurde gezeigt, daß unter dem zur Vitamin B-Gruppe gehörenden Lactoflavin auch eine Hyposiderämie auftreten kann. Die letztgenannten Autoren wiesen dabei diesem Vitamin eine besondere Rolle bei der Hämsynthese zu. Nach W. Beiglböck u. R. Clotten soll demgegenüber die Pantothensäure, welche als Teil des Coenzyms A bei den Acetylierungsvorgängen unentbehrlich ist, zu einer Erhöhung des Serumeisenspiegels führen, ein Befund, der jedoch von W. Neuweiler nicht erhoben wurde, wohl infolge einer niedrigeren Dosierung.

Ein Vitamin, dem dank seiner reduzierenden Eigenschaften schon frühzeitig eine besondere Bedeutung für den Eisenstoffwechsel zuerkannt wurde, ist die Ascorbinsäure. So konnten L. Heilmeyer u. I. v. Mutius bei der Prüfung von Nahrungsmitteln in vitro eine Steigerung des Lösungseffektes für Eisen durch Vitamin C-Zusatz beobachten. Verfolgungen des Serumeisenspiegels bei alleiniger oraler Vitamin C-Zufuhr

ergaben keine sicheren Hinweise für eine bessere Nutzung des Nahrungseisens. Erst bei gleichzeitiger oraler Eisen-Medikation wurde ein überzeugender Anstieg des Serumeisens gesehen (L. Heilmeyer; F. Thedering). In diesem Zusammenhang mußte es daher interessieren, dem Organismus eigene andere reduzierende Substanzen wie das SH-Glutathion — das bei der Aktivierung des Sulfhydrilsystems (A. Borden u. Mitarb.; D. Bergenstal u. Mitarb.; R. Sprague; W. Beiglböck u. Mitarb.) eine erhebliche Rolle spielt — und das Cystein zu untersuchen. War doch auch für diese Substanzen auf Grund der Untersuchungen von J. Groen u. Mitarb. sowie von W. Rummel u. Mitarb. bekannt, daß sie zu einer vermehrten Eisenresorption führen können. — Für das Cystein fanden auch wir ein entsprechendes Ergebnis (F. Wöhler, L. Heilmeyer, D. Emrich u. S. H. Kang). Die sehr interessanten Modellversuche von A. Mazur u. Mitarb. wie auch die von H. J. Bielig u. E. Bayer ließen außerdem erkennen, daß das SH-Glutathion bei der Reduktion des dreiwertigen Ferritineisens zu freien Ferro-Ionen und ihrer Aufnahme vom Transferrin möglicherweise auch im Organismus mitbeteiligt ist.

Da die zitierten wichtigen Befunde sich im wesentlichen nur auf Untersuchungen des Serumeisenspiegels beschränken, erschien es angebracht, eine mögliche weitere Klärung des Eisenstoffwechselgeschehens unter der Wirkung dieser Stoffe im Tierexperiment zu erreichen. Zu prüfen war eine mögliche vermehrte Eisenresorption wie das Verhalten der Speichereisenfraktionen des Ferritins und Hämosiderins im Kurz- bzw. Dauerversuch unter ACTH, Cortison, DOCA, Thyroxin, Lactoflavin, Pantothensäure, Ascorbinsäure, SH-Gluthathion und Cystein.

Material und Methoden

Zur Untersuchung kamen 90 Meerschweinchen aus einem gesunden Inzuchtstamm mit einem Durchschnittsgewicht von etwa 400 g. Es wurde besonderer Wert darauf gelegt, daß die Tiere gleich alt waren, da Vorversuche zeigten, daß der Eisengehalt der Organe stark vom Alter der Tiere abhängig ist. Die Versuchstiere erhielten eine einheitliche Ernährung aus Grünfutter und Körnern.

ACTH (Fa. Schering, Berlin) wurde in der Dosis von 100 mg/kg einmalig i.p. und im Dauerversuch als Depot-ACTH zu 50 mg kg täglich 6 Tage lang i.m. appliziert. Cortison (Fa. Schering) kam einmalig zu 25 mg kg i.p. zur Anwendung. Depot-Cortison wurde 6tägig zu 50 mg kg täglich i.m. gegeben. DOCA (wasserlösliches Percorten, Fa. Ciba, Wehr) wurde im Kurzversuch einmalig zu 50 mg/kg i.p. verabreicht. Lactoflavin (Beflavin, Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach) verabreichten wir 10 Tage lang zu 4 mg kg i.p. täglich. Pantothensäure (Bepanthen, Fa. Hoffmann-La Roche) kam in der Dosis von 20 mg kg täglich i.p. während 7 Tagen zur Anwendung. Ascorbinsäure (Fa. Merck, Darmstadt) wurde im Kurzversuch einmalig zu 2 g/kg oral so gegeben, daß die Dosis über 2 Std verteilt verabreicht wurde. Im Dauerversuch erhielten die Tiere 10 Tage oral täglich 500 mg kg. Reduziertes Glutathion (Fa. Hoffmann-La Roche) kam während 10 Tagen zu 100 mg kg i.p. täglich zur Injektion. Cystein (Hormodyn forte, Fa. Nordmark, Hamburg) wurde

einmalig in der Dosis von 400 mg/kg i.p. appliziert, im Dauerversuch über 10 Tage wurde es zu 200 mg/kg täglich i.p. gegeben. Thyroxin (Fa. Hoffmann-La Roche) wurde im Gewöhnungsversuch über 7 Tage täglich zu 1 mg/kg i.m. injiziert. Eine Kontrollgruppe erhielt aus Vergleichsgründen während 10 Tagen täglich oral 100 mg/kg Ferrum sulfuricum siccatum (DAB 6), entsprechend etwa 33 mg Fe-II-Ionen pro kg Körpergewicht. Einer weiteren Kontrollgruppe wurde Diphtherie-Toxin (Behring-Werke, Marburg) in der Dosierung von 3 mal ½ dlm pro Tier über 6 Tage verteilt s.c. injiziert. Die quantitative Ferritineisenbestimmung erfolgte in einer Modifikation der früher von W. Keiderling u. F. Wöhler angegebenen Methode, wie sie in der Mitteilung von F. Wöhler, L. Heilmeyer, D. Emrich u. S. H. Kang ausführlich dargelegt wurde. Die Bestimmung des gesamten Organeisens erfolgte nach feuchter Veraschung (H. Neumann) quantitativ chemisch nach L. Heilmeyer u. K. Plötner. Durch Subtraktion des Ferritin- und des Hämoglobineisens wurde unter Vernachlässigung des Fermenteisens ein Wert erhalten, den wir in früheren Mitteilungen als Hämosiderineisen bezeichneten. Da aber histochemisch oft trotz eines sicher erhöhten „Hämosiderineisengehaltes" kein Hämosiderin nachzuweisen war, entschlossen wir uns, nach einem Vorschlag von L. Heilmeyer dieses Organeisen als *Nicht-Ferritineisen* zu bezeichnen, wobei wir von der Vorstellung ausgingen, daß das sog. histochemisch darstellbare Hämosiderin erst dann nachzuweisen ist, wenn eine bestimmte Konzentration pro Raumeinheit erreicht wird. Es ist also unter dem Begriff des Nicht-Ferritineisens sowohl das histochemisch nachweisbare Hämosiderineisen wie das nicht in Erscheinung tretende intracelluläre Eisen zu verstehen, wobei allerdings aus technischen Gründen das Fermenteisen vernachlässigt wird. Letzteres darf als erlaubt gelten, da es ja nur in sehr geringer Menge vorhanden ist.

Die histochemische Eisendarstellung in den Geweben erfolgte einmal vermittels der Turnbullblau-Reaktion nach J. Tiermann u. W. Schmeltzer in der Modifikation von W. Hueck, ferner einer von R. de Vinals angegebenen und von F. Wöhler modifizierten histochemischen Eisendarstellung, wie sie in der oben angegebenen Mitteilung ausführlich beschrieben wurde.

Durch statistische Auswertung der Ergebnisse in Milligrammprozent wurde die Signifikanz der Unterschiede zweier Durchschnitte geprüft. Da es sich um kleine Stichproben handelt, wurde nach A. Linder die Kurve der Häufigkeitsverteilung von t, welche symmetrisch, aber etwas flacher als die Normalverteilungskurve verläuft, benutzt. Lagen die ermittelten Werte außerhalb der Sicherheitsgrenze der t-Verteilung zu $P = 0{,}01$, so wurden sie als signifikant bezeichnet. (In den Abbildungen als S gekennzeichnet.)

Ergebnisse

Normaltiere: Es wurde von 5 Meerschweinchen der Ferritin- und Nicht-Ferritineisengehalt von Duodenum, Dünndarm, Leber, Milz und Niere bestimmt, um vergleichbare Ausgangswerte zu erhalten. Obwohl der Nicht-Ferritineisengehalt des Duodenums und Dünndarms wahrscheinlich etwas zu hoch ausfiel, da trotz sorgfältigster Spülung mit eisenfreiem aqua. bidest. fraglich eisenimbibierte Schleimreste aus den Drüsenschläuchen des Magens oder den Schleimhautfalten des Darmes nicht sicher zu entfernen waren, glaubten wir uns berechtigt, diese Werte zum Vergleich gegenüber den Versuchsgruppen dann heranziehen zu dürfen, wenn die Unterschiede gegenüber den Normaltieren beträchtlich waren.

Ergebnisse des Kurzversuches: In früheren Versuchen von F. Wöhler konnte schon gezeigt werden, daß ACTH und Cortison nach 6 Std zu Eisenverschiebungen im Organismus führen können, wie sie ähnlich von L. Heilmeyer u. Mitarb. beim Infekt gefunden wurden. In Ergänzung

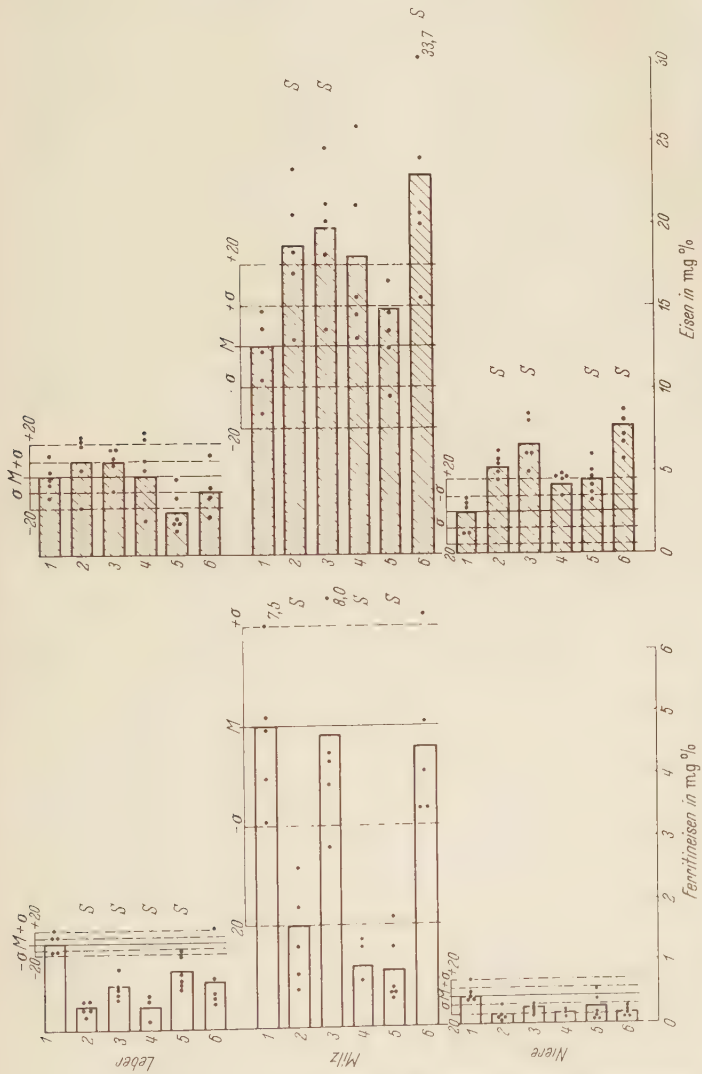


Abb. 1. Ferritin- und Nichtferritineisengehalt in Leber, Milz und Niere des Meerschweincheus, 8 Std nach intraperitonealer Injektion von ACTH, Cortison, DOCA, Cystein und oraler Gabe und Ascorbinsäure. 1: normal, 2: ACTH 100 mg/kg i.p., 3: Cortison 25 mg/kg i.p., 4: DOCA 50 mg/kg i.p., 5: Cystein 400 mg/kg i.p., 6: Ascorbinsäure 2 g/kg oral

dieser Befunde und zur eventuellen Klärung des Wirkungsmechanismus erhielten 5 Versuchsgruppen zu je 5 Tieren ACTH, Cortison, DOCA, Cystein und Ascorbinsäure. Wie die Abb. 1 erkennen läßt, kam es unter diesen Substanzen in der Leber mit Ausnahme der Ascorbinsäuregruppe

zu einer sicheren Verminderung der Ferritineisenfraktion, während der Nicht-Ferritineisengehalt keine Veränderungen erkennen ließ. In der

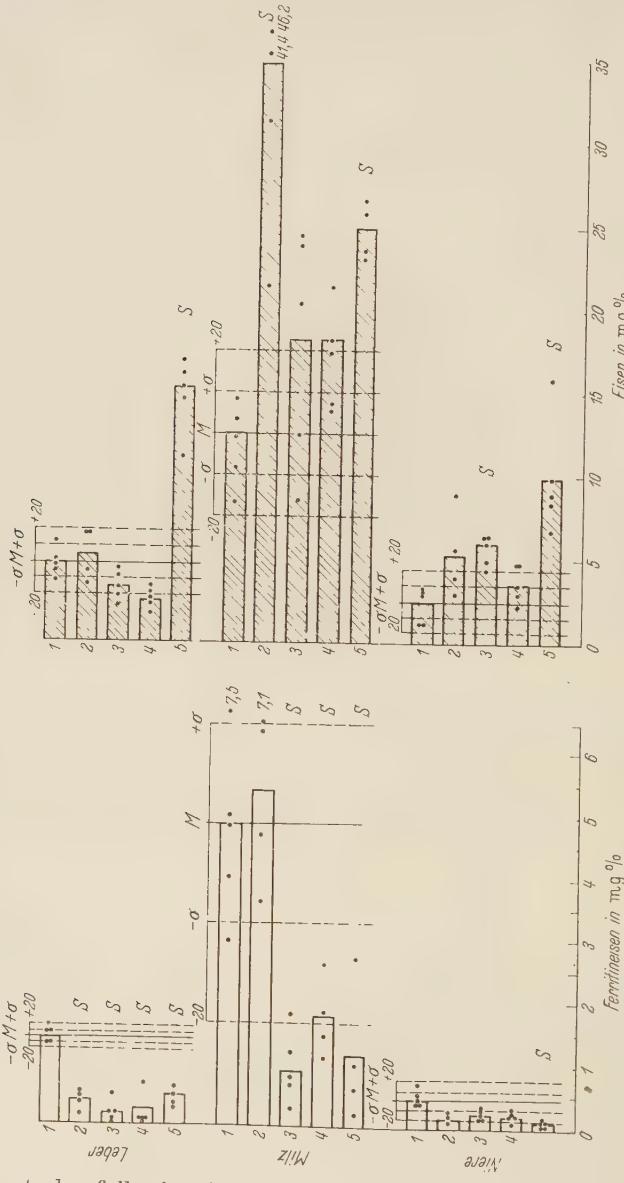


Abb. 2. Verhalten des Ferritin- und Nichtferritineisens in Leber, Milz und Niere des Meerschweinchens nach Verabreichung von Diphtherietoxin, ACTH, Cortison und Thyroxin. 1: normal, 2: Di-Toxin 3 mal ½ dlm s.c. in 6 Tagen, 3: Depot-ACTH täglich 50 mg/kg i.m. nach 6 Tagen, 4: Depot-Cortison täglich 50 mg/kg i.m. nach 6 Tagen, 5: Thyroxin täglich 1 mg/kg i.m. nach 7 Tagen

Milz trat ebenfalls eine Abnahme des Ferritineisens unter ACTH, DOCA und Cystein ein, doch blieb überraschenderweise eine Verminderung dieser Fraktion unter Cortison und Ascorbinsäure aus. Demgegenüber

zeigte das Nicht-Ferritineisen in der Milz, abgesehen von der DOCA- und Cysteingruppe einen deutlichen Anstieg. In der Niere führten die genannten Substanzen zu keinen ausgesprochenen Veränderungen des

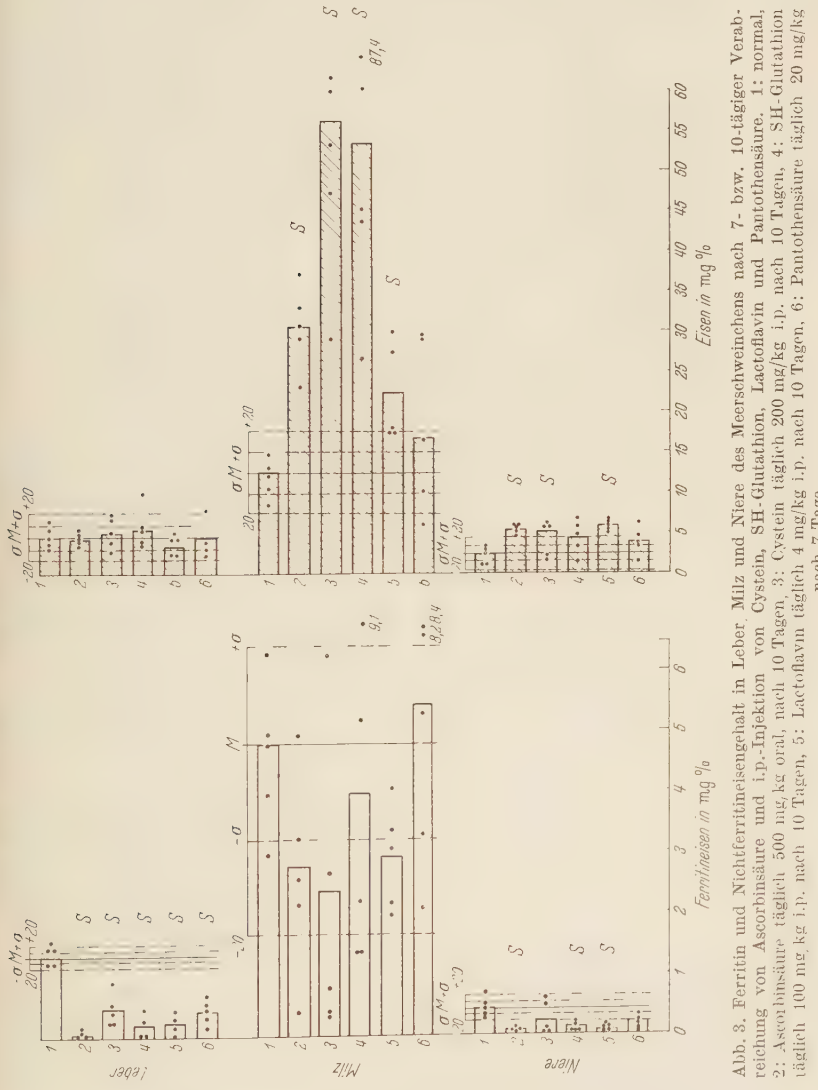


Abb. 3. Ferritin und Nichtferritineisengehalt in Leber, Milz und Niere des Meerschweinchens nach 7- bzw. 10-tägiger Verabreichung von Ascorbinsäure und i.p.-Injektion von Cystein, SH-Glutathion, Lactoflavin und Pantothensäure. 1: normal, 2: Ascorbinsäure täglich 500 mg/kg oral, nach 10 Tagen, 3: Cystein täglich 200 mg/kg i.p. nach 10 Tagen, 4: SH-Glutathion täglich 100 mg kg i.p. nach 10 Tagen, 5: Lactoflavin täglich 4 mg/kg i.p. nach 10 Tagen, 6: Pantothensäure täglich 20 mg/kg nach 7 Tage

Ferritineisens, während eine Vermehrung des Nicht-Ferritineisens unter ACTH, Cortison, Cystein und der Ascorbinsäure deutlich wurde.

Ergebnisse der Dauerversuche. Nachdem diese Befunde eine gewisse Gleichartigkeit im Verhalten der Speichereisenfraktionen erkennen

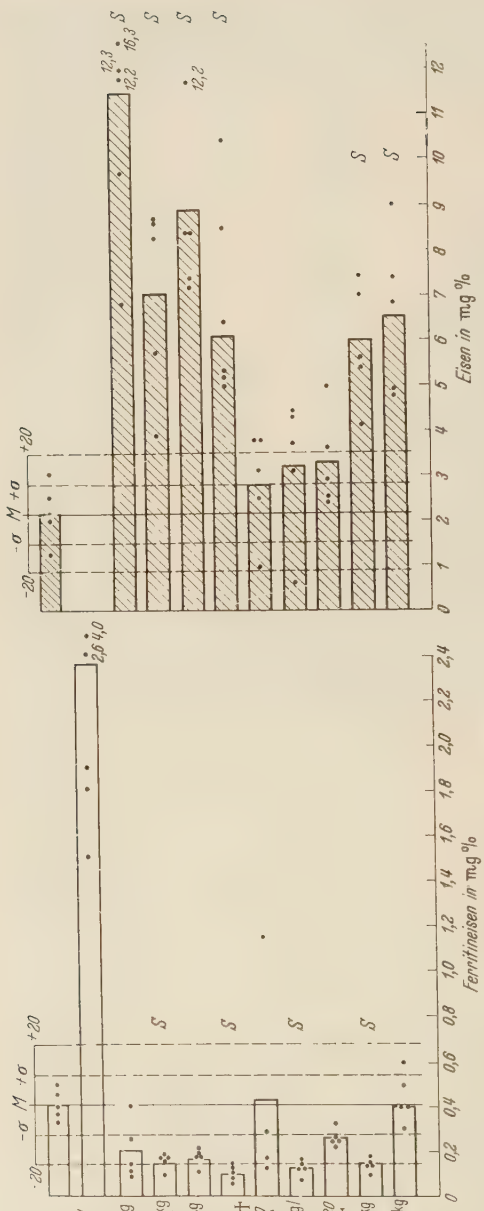


Abb. 4. Verhalten des Ferritin- und Nichtferritineisens im Duodenum des Meerschweinchens unter verschiedenen experimentellen Bedingungen

ließen, war es von großem Interesse, die Veränderungen im Dauerversuch unter einem erheblichen entzündlichen Reiz, wie es die mehrmalige Gabe von Diphtherie-Toxin für das Meerschweinchen darstellt, sowie nach ACTH, Cortison, Thyroxin, Ascorbinsäure, Cystein, SH-Glutathion, Lactoflavin und Pantothensäure zu prüfen. Wie Abb. 2 zeigt, führte der schwere entzündliche Reiz erwartungsgemäß zu einer exzessiven Zunahme des Nicht-Ferritineisens in der Milz, während diese Fraktion in der Leber sich nicht veränderte, in der Niere zunahm ($P = 0{,}05$). Die Ferritineisenfraktion nahm in der Leber stark, in der Niere nicht in demselben Maße ab ($P = 0{,}05$), in der Milz lag sie im Normbereich.

Im Dauerversuch unter ACTH und Cortison mit relativ hohen Dosen kam es zu einer sicheren Verminderung des Ferritineisengehaltes in Leber und Milz, in der Niere trat keine Änderung dieser Fraktion ein. Das Nicht-Ferritineisen zeigte in der Leber keine sichere Beeinflussung, auch in der Milz war keine sichere Veränderung unter ACTH

und Cortison nachzuweisen, wenn vielleicht auch eine leichte Zunahme des Nicht-Ferritineisens eingetreten war. In der Niere stieg das Nicht-Ferritineisen nur unter ACTH an.

Das Thyroxin führte in Leber, Milz und Niere zu einer starken Verringerung des Ferritineisens, überraschenderweise war in den gleichen Organen das Nicht-Ferritineisen erheblich vermehrt.

Unter Ascorbinsäure, Cystein, SH-Glutathion, Lactoflavin und Pantothensäure kam es zu einer starken Verminderung des Ferritineisens in der Leber, in der Milz riefen diese Substanzen dagegen keine Veränderung dieser Fraktion hervor. In der Niere führten nur Ascorbinsäure, SH-Glutathion und Lactoflavin zu einer Verringerung des Ferritineisens. Das Nicht-Ferritineisen blieb in der Leber praktisch unbeeinflußt, in der Milz trat eine starke Zunahme ein, die lediglich unter der Pantothensäure vermißt wurde. In der Niere kam es zu einem Anstieg unter Ascorbinsäure, Cystein und Lactoflavin.

Zur Klärung der Frage, ob unter den verabfolgten Substanzen etwa auch eine vermehrte Eisenresorption stattfindet, bestimmten wir den Ferritin- und Nicht-Ferritineisengehalt im Duodenum und Dünndarm des Meerschweinchens. Abb. 4 gibt die Ergebnisse des Duodenums wieder. Neben dem Normalwert des Ferritineisens kommt ein maximaler Ferritineisenwert nach 10tägiger Eisenfütterung vergleichsweise zur Darstellung, da, wie wir früher zeigen konnten (F. Wöhler, L. Heilmeyer, D. Emrich u. S. H. Kang), eine vermehrte Eisenresorption physiologischerweise, z. B. bei Eisenfütterung, mit einer sehr starken Zunahme des Ferritineisens in den Mucosazellen und einer gewissen Hämosiderinanreicherung in der lamina propria der Zotten einhergeht. Andererseits konnte aber auch gezeigt werden, daß eine vermehrte Eisenresorption bei niedrigem Ferritineisen in den Mucosazellen stattfinden kann, wenn durch eine schnelle Reduktion des Ferritineisens die so freigesetzten Ferro-Ionen vermehrt dem Organismus angeboten werden. Da dabei das Angebot die Aufnahmefähigkeit in der Zeiteinheit zu übersteigen scheint, kommt es dann zu ausgeprägten, histochemisch nachweisbaren Hämosiderinablagerungen in der lamina propria der Zotten, bzw. zum Anstieg des Nicht-Ferritineisens.

Cortison, Ascorbinsäure, Lactoflavin und Cystein bewirkten eine deutliche Verminderung der Ferritineisenfraktion des Duodenums während die anderen Substanzen zum Teil nur eine angedeutete oder gar keine Wirkung auf diese Fraktion erkennen ließen. Das Nicht-Ferritineisen nahm unter ACTH, Cortison, Thyroxin, Ascorbinsäure und Cystein beträchtlich zu, während die durch SH-Glutathion, Lactoflavin und Pantothensäure hervorgerufenen Veränderungen noch im Normbereich liegen. Daß selbst eine gleichzeitige Eisengabe nicht zu einer Erhöhung des Ferritineisens im Duodenum führt, zeigt die Darstellung des

Parallelversuches mit Cystein und oraler Eisengabe über die Dauer von 10 Tagen, wobei eine sichere vermehrte Eisenresorption stattfand, über die in der oben zitierten Mitteilung berichtet wurde.

Die histochemische Eisendarstellung in den untersuchten Geweben, vor allem aber in der Milz, lief etwa parallel den quantitativ chemisch erhobenen Eisenwerten. Eisenablagerungen in der lamina propria von Dünndarmzotten fanden wir unter Thyroxin, ACTH, Cortison, Ascorbinsäure und Cystein. Diese Reihenfolge entsprach etwa dem semiquantitativen histochemischen Befund. Im Magen wurde kein sicher verwertbarer Eisenbefund erhoben. Auch die Veränderungen in Leber und Niere waren nicht derart, daß sie gegenüber den Normaltieren erhebliche Abweichungen erkennen ließen.

Diskussion

Die Gültigkeit der Modellversuche von A. Mazur u. Mitarb. sowie von H. J. Bielig u. E. Bayer erfuhren durch die geschilderten Ergebnisse auch für den Organismus ihre Bestätigung. Die sicher reduzierend wirkenden Substanzen der Ascorbinsäure, des Cysteins, des SH-Glutathions und auch des Lactoflavins führten nämlich zu Änderungen des intermediären Eisenstoffwechsels, die gekennzeichnet sind durch eine Freisetzung von Eisen-Ionen aus dem Ferritineisen, vor allem der Leber und Speicherung dieser Eisen-Ionen im RES, insbesondere der Milz in der Form des Hämosiderins. Die Parallelität im Verhalten des Eisenstoffwechsels unter den SH-Verbindungen und nach dem schweren entzündlichen Reiz legt die Vermutung nahe, daß auch beim Infekt eine Aktivierung von Sulfhydrylverbindungen eintritt. In einem geringeren Maße scheint dies auch für ACTH und Cortison zuzutreffen. Interessanterweise ergab dabei der Kurzversuch charakteristischere Veränderungen als sie der Dauerversuch erkennen ließ. Inwieweit hier gegenregulatorische Vorgänge eine Rolle spielen, muß offen gelassen werden. Nachdem für den Infekt sowie nach Gabe von ACTH, Cortison und auch DOCA sowie Lactoflavin eine Hyposiderämie bekannt ist, darf angenommen werden, daß hierbei auch eine Freisetzung von Eisen-Ionen vom Transferrin erfolgt. Für die Ascorbinsäure trifft dies jedoch scheinbar nicht zu (K. H. Schäfer u. Mitarb.; W. Neuweiler u. a.).

Überraschend war, daß unter ACTH und Cortison eine vermehrte Eisenresorption stattfand, wie die Untersuchungen des Darmtraktes zeigten. Aber auch unter der Ascorbinsäure fanden wir bei alleiniger oraler Zufuhr eine vermehrte Ausnutzung des Nahrungseisens im Sinne einer vermehrten Eisenresorption. Ob unter dem SH-Glutathion und dem Lactoflavin sowie der Pantothensäure eine sichere Eisenresorption stattfand, kann aus unseren Versuchen nicht ausgesagt werden, wenn auch J. Groen u. Mitarb. eine solche für das SH-Glutathion annehmen.

Für das Cystein erscheint jedoch die vermehrte Eisenresorption gesichert (J. Groen u. Mitarb.; W. Rummel u. Mitarb.; F. Wöhler, L. Heilmeyer, D. Emrich u. S. H. Kang).

Eine besondere Stellung in seiner Wirkung auf den Eisenstoffwechsel gegenüber den anderen geprüften Substanzen nimmt das Thyroxin ein. Wie W. Keiderling u. Mitarb. in Bestätigung älterer Untersuchungen mittels Radioeisen und Radiochrom zeigen konnten, führt es zu einer Verkürzung der Erythrocytenlebenszeit und zu einer Aktivierung der Erythropoese und ruft damit einen besonderen Eisenbedarf des Organismus hervor. Wie die Ergebnisse zeigten, kam es zu einer Verringerung des Ferritineisens in den Organen bei starker Zunahme des Hämosiderins. Da die Tiere während der Thyroxingabe durchschnittlich 25—30% ihres Körpergewichtes verloren, muß offen bleiben, ob die starke Verminderung des Ferritineisens nicht etwa auch Ausdruck des allgemeinen Eiweißabbaus — in diesem Falle des Apoferritins — sein kann. Ein Befund, den wir auch im Tierexperiment bei Mangelernährung sahen (F. Wöhler, noch unveröffentlicht) und der beim Menschen etwa der Eisenphanerose beim Unterernährten entspricht (L. Heilmeyer, F. Wöhler u. W. Keiderling u. a.). Gesichert erscheint jedoch die vermehrte Eisenresorption.

Die von W. Beiglböck u. R. Clotten beobachtete Hypersiderämie nach großen Pantothensäuregaben kann möglicherweise durch die im Tierversuch gesehene Freisetzung von Eisen-Ionen aus dem Leberferritin und ihre Aufnahme vom Transferrin erklärt werden.

Summary

The administration of ACTH, Cortison, DOCA and of reducing substances as ascorbic acid, cysteine, SH-glutathion and lactoflavine diminished the ferritin iron in the liver while the non-ferritin-iron (haemosiderin) in the spleen considerably increased. It therefore appears possible that in infection the transformation of iron from ferritin into haemosiderin takes place through activation of sulfhydryl groups. The pantothen-acid also diminished content of ferritin-iron in the liver. The injection of thyroxin caused a diminution of the ferritin iron in the organs of the guinea pig while the non-ferritin-iron considerably increased. The absorption of iron from the gastrointestinal tract increases during the application of ACTH, Cortison, ascorbic acid, cysteine and thyroxin.

Literatur

Aschkenasy, A., u. E. Renier: Sang. **25**, 31—41 (1954). — Beiglböck, W., H. Hoff u. R. Clotten: Zur Frage der Cortisonwirkung. Selbstverlag Augsburg 1950. — Beiglböck, W., u. R. Clotten: Verhdlg. deutsch. Ges. f. inn. Med. S. 410 (1955). — Bergenstal, D. M., R. L. Landau, J. Kirsner and K. Lugibihl: Proc. 2nd. Clin. ACTH Conf. **1**, 250 (1951). — Bielig, H. J., u. E. Bayer: Naturwissenschaften **42**, 466 (1955). — Borden, A. L., E. B. Wallraff, E. C. Brodie,

W. P. Holbrook, D. F. Hill, C. A. F. Stephens jr., R. B. Johnson and A. R. Kemmerer: Federat. Proc. **10**, 376 (1951). — Braunsteiner, H., E. Gisinger u. F. Pakesch: Klin. Wschr. **1952**, 394. — Cartwright, G. E., L. D. Hamilton, C. J. Gubler, M. M. Wintrobe, N. M. Fellows and H. Ashenbrucker: J. Clin. Invest. **30**, 161 (1951). — Groen, J., W. A. van den Broek und H. Veldman: Biochim. et Biophysica acta **1**, 315 (1947). — Heilmeyer, L.: Die Eisentherapie und ihre Grundlagen. Leipzig: S. Hirzel 1944. — Presentation for International Symposium. U. C. Medical Center 1957. San Franzisco. — Heilmeyer, L., u. I. v. Mutius: Z. exper. Med. **112**, 192 (1942). — Heilmeyer, L., u. K. Plötner: Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit. Jena: Gustav Fischer 1937. — Heilmeyer, L., F. Wöhler u. W. Keiderling: Acta haematol. (Basel), **12**, 154 (1954). — Hueck, W.: Pigmentstudien. Beitr. path. Anat. Jena 1937. — Jacobi, H., K. Pfleger u. W. Rummel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 198—206 (1956). — Keiderling, W., H. A. E. Schmidt u. M. Lee: Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung Bd. II. S. 24. München u. Berlin: Urban u. Schwarzenberg 1956. — Keiderling, W., u. F. Wöhler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 418 (1954). — Larizza, P., S. Ventura, D. Meduri u. L. Larizza: Haematologica (Pavia) **38**, 611—638 (1954). — Linder, A.: Statistische Methoden. Basel: Verlag Birkhäuser 1951. — Mazur, A., S. Baez and E. Shorr: J. of Biol. Chem. **213**, 147 (1955). — Neumann, H.: Z. physiol. Chem. (Leipzig) **37**, 115 (1902/03). — Neuweiler, W.: Internat. Z. Vitaminforsch. **16**, 1 (1945); **18**, 70 (1947). — Schäfer. K. H.: Ergeb. inn. Med. **4**, 607 (1953). — Schäfer, K. H., u. J. Boenecke: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 666 (1949). — Schmeltzer, W.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **50**, 99 (1933). — Schröder, H., u. M. Braun-Stappenbeck: Klin. Wschr. **1941**, 979. — Sprague, R. G.: Amer. J. Med. **10**, 567 (1951). — Stich, W., u. H. Wolff: Klin. Wschr. **1951**, 356. — Thedering, F.: Dtsch. med. Wschr. **1949**, 921. — Tiermann, J.: Görbersdorfer Veröffentlichungen 2 (1898). — Vinals, R. R. de, and A. del Campo: Fol. clin. Internac. VI. Mai (1956). — Wöhler, F.: Verhdlg. Deutsch. Ges. inn. Med. 537 (1956). — Wöhler, F., L. Heilmeyer, D. Emrich u. S. H. Kang: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **230**, 107 (1957).

Dr. med. F. Wöhler, Med. Univ.-Klinik Freiburg/Brsg. Hugstetter Str. 55

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 513—523 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. F. Heim)

Ausscheidungsprodukte des Salyrgans im Harn

Von
Fred Leuschner

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. Februar 1957)

Für das Verständnis der pharmakologischen Wirkung des Salyrgans ist es von Bedeutung, die Struktur und die zeitliche Folge der Quecksilberverbindungen zu kennen, die im Harn nach Verabreichung von Salyrgan ausgeschieden werden. Aus der genauen Kenntnis der chemischen Zusammensetzung dieser Verbindungen können für die celluläre Bindung des Hg in der Niere Hinweise erwartet werden.

Als Ausscheidungsprodukte des Salyrgans vermutet Möller (I und II) das ungespaltene oder wenig veränderte Molekül. Auch über die Ausscheidungsprodukte anderer organischer Hg-Diuretika liegen nur wenig Kenntnisse vor (Handley II). So wurde in jüngster Zeit gefunden, daß nach Mercuhydrin zwei noch zu identifizierende organische Hg-Verbindungen im Harn auftreten (Handley III).

Methodischer Teil

1. Anreicherung und Reinigung der Hg-Verbindungen im Harn. Jeweils 100 m Harn wurden auf 0° C abgekühlt und zentrifugiert. Es ließ sich ein Kristallbrei abtrennen, der nach einmaliger Waschung mit Wasser bei 0° C annähernd Hg-frei war. Das Überstehende wurde in gefrorenem Zustand zur Trockne gebracht und nacheinander mit 3 ml und 2 ml Wasser und 1 ml 1%iger wäßriger Ammoniaklösung extrahiert. Aus dieser Lösung ließ sich mit 6 Volumen Aceton eine nach zweimaliger Waschung praktisch Hg-freie Fraktion abtrennen. Eine sich gleichzeitig absetzende braune, Harnfarbstoffe enthaltende Flüssigkeit wurde mit dem Überstehenden abgegossen. Der weitaus größte Teil des Hg konnte nun durch weiteren Zusatz von 14 Volumen Aceton gewonnen werden. Neben dem Bodenkörper fanden sich in der Regel noch wenige Tropfen der braunen, Hg-haltigen Flüssigkeit. In Wasser oder in 1%iger wäßriger Ammoniaklösung aufgenommen, eignet sich dieser Rückstand zur Papierchromatographie.

2. Papierchromatographie. Alle Untersuchungen wurden auf Schl. & Sch.-Papier Nr. 2043b bei Zimmertemperatur ausgeführt. Vom Harn wurden 50—120 μl — vom Konzentrat entsprechend weniger — mit Mikropipetten auf das Papier aufgetragen und im kalten Luftstrom getrocknet. Die Zusammensetzung der Lösungsmittelgemische ist aus der Tab. 1 zu entnehmen.

3. Die quantitative Hg-Bestimmung erfolgte nach Griffini u. Gerosa. Die Hg-Bestimmung in Chromatogrammflecken wurde nur in Papieren vorgenommen,

die mit n/10 HCl gewaschen und gut mit bidestilliertem Wasser gespült worden waren. Der Leerwert der Papiere schwankte zwischen 0,1 und 0,6 μg Hg/cm^2.

4. Nachweis funktioneller Gruppen auf dem Chromatogramm:

a) Sulfhydrylgruppen nach Toennies u. Kolb. Reagens I: 1,5 g Nitroprussidnatrium gelöst in 5 ml 2n H_2SO_4 + 95 ml Methanol + 10 ml 25%ige wäßrige Ammoniaklösung, filtrieren und in der Kälte aufbewahren. Reagens II: 2 g KCN gelöst in 5 ml Wasser + 95 ml Methanol. SH-Gruppen werden durch Eintauchen in das Reagens I nachgewiesen. Zur Färbung von Disulfiden und leicht spaltbaren Hg-Mercaptiden wird mit Reagens II nachbehandelt.

Tabelle 1. *Lösungsmittelgemische für die Trennung der Hg-Verbindungen im Harn und die Identifizierung des Cysteins und Cystins*

Zusammensetzung der Lösungsmittelgemische	Bemerkungen
Aceton : 10%ige wäßrige Ammoniaklösung (85 : 15)	Absteigende Methode, in 20 Std genügende Auftrennung der Harnverbindungen.
Pyridin : Wasser (65 : 35)	Aufsteigende Methode.
Sek. Butanol : 99—100%ige Ameisensäure : Wasser (75 : 13,2 : 11,8)	Aufsteigende Methode, mit und ohne H_2S- oder N_2-Atmosphäre.
96%iger Äthylalkohol	Aufsteigende Methode, mit und ohne H_2S- oder N_2-Atmosphäre.
Propanol-(1) : 10%ige wäßrige Ammoniaklösung (85 : 15)	Absteigende Methode, in 20—24 Std genügende Auftrennung der Harnverbindungen.

b) Hg-Nachweis mit Diphenylthiocarbazon (Dithizon). Die Papiere werden mit einer Lösung gesprayt, die 0,5 mg Dithizon/ml Chloroform enthält. Ganz besonders nach alkalischen Steigflüssigkeiten muß das Chromatogramm mit n/10 HCl angesäuert werden, um die roten Flecke auf grünem Grund hervortreten zu lassen.

c) Hg-Nachweis mit Kupferjodid. Reagens I: 5 g KJ und 20 g $Na_2SO_3 \cdot 7\ H_2O$ in 100 ml Wasser gelöst. Reagens II: 5 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ in 100 ml n HCl gelöst. Hg führt zu orangeroten Flecken.

d) Ninhydrinreaktion. Reagens: 200 mg Ninhydrin werden in 95 ml Butanol und 5 ml 2 n Essigsäure gelöst.

5. Die UV-Aufnahmen wurden mit einem Spektralphotometer Beckman DU ausgeführt.

6. Präparation der Salyrganverbindungen:

a) Salyrgan-L(+)-Cystein (1 : 1). 121 mg (1 mMol) L(+)-Cystein wurden in 20 ml n/10 NaOH unter Zusatz von 506 mg (1 mMol) Salyrgan (theophyllinfrei) gelöst. Das Salyrganmercaptid wurde zwischen 6 und 18 Volumen Aceton ausgefällt, mit Aceton und Äther gewaschen und über $CaCl_2$ aufbewahrt. Papierchromatographie: Eigenschaften der Hauptfraktion in Tab. 2 und 3. Die mengenmäßig geringen Nebenkomponenten (Tab. 5) enthielten alle Hg und SH-Gruppen, die sich nach KCN-Behandlung nachweisen ließen.

b) Beim Versuch der Präparation der Salyrgan-Cystin-Verbindung wurden 121 mg (0,5 mMol) L(−)-Cystin in 20 ml n/10 NaOH unter Zusatz von 506 mg (1 mMol) Salyrgan (theophyllinfrei) gelöst. Die weitere Handhabung erfolgte wie beim Salyrgan-Cystein.

c) Zur Darstellung der schwefelhaltigen Vergleichssubstanzen der Harnfraktion 2 wurden jeweils 0,1 mMol der in Tab. 4 genannten Verbindungen unter Zusatz von 51 mg (0,1 mMol) Salyrgan (theophyllinfrei) in 2 ml n/10 NaOH gelöst. Positionskonstanten in Tab. 4.

Ergebnisse und Besprechung

Anreicherung und teilweise Reinigung der Hg-Verbindungen aus menschlichem Harn. Um eine gleichmäßige Zusammensetzung der Harnausscheidungsprodukte des Salyrgans zu erzielen, erhielten die Versuchspersonen i.v. 2,5 mg Salyrgan (theophyllinfrei)/kg Körpergewicht, eine

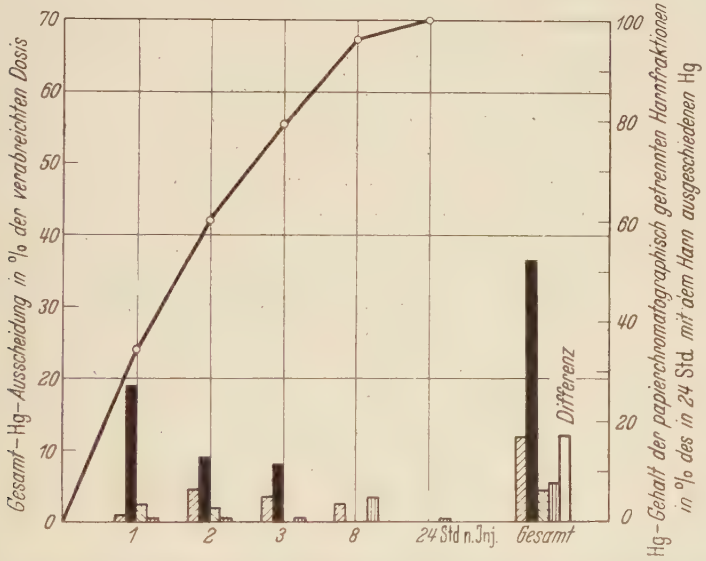


Abb. 1. Gesamt-Hg-Ausscheidung im menschlichen Harn (in % der verabreichten Salyrgan-Dosis) in den ersten 24 Std nach der intravenösen Injektion von 2,5 mg Salyrgan/kg Körpergewicht und Zusammensetzung der papierchromatographisch getrennten Harnfraktionen (% des in 24 Std mit dem Harn ausgeschiedenen Hg). ▨ Harnfraktion 1, ■ Harnfraktion 2, ▧ Harnfraktion 3 und 4, ▥ Harnfraktion 5. Mittelwerte aus 3 bis 6 Bestimmungen

Dosis, die zu einer ausgeprägten Diurese führte. Es wurden nur Personen zum Versuch herangezogen, deren Harn ein p_H zwischen 6,2 und 7,4 aufwies. Die gemäß Abb. 1 gesammelten Harnproben wurden bis zur endgültigen Verwendung in gefrorenem Zustand aufbewahrt. Die Hg-Bestimmung in den Proben ergab Konzentrationen, die in Abb. 1 zusammengestellt sind. Danach haben im Mittel 50% des am ersten Tag nach der Salyrganinjektion ausgeschiedenen Hg die Niere nach etwa 90 min passiert. Diese Beobachtungen entsprechen den in der Literatur mitgeteilten Befunden (Möller II; Burch u. Mitarb.).

Der Harn läßt sich unmittelbar zur papierchromatographischen Trennung verwenden, wenn die Hg-Konzentration 0,02% übersteigt.

Harnproben mit niedrigerem Gehalt wurden durch Gefriertrocknung angereichert. Für die Identifizierung der Ausscheidungsprodukte erwies sich neben der Konzentrierung eine zusätzliche Reinigung von begleitenden Harnsubstanzen als vorteilhaft.

Der Versuch, die Hg-Verbindungen mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln aus dem Harn zu extrahieren, verlief negativ. Die Reinigung wurde deshalb durch mehrstufige fraktionierte Fällung vorgenommen. Dabei ließ sich eine amorphe Komponente gewinnen, die annähernd das gesamte Hg enthielt. In ihr lagen die Hg-Verbindungen in einer Zusammensetzung vor, die derjenigen des Harns entsprach (wie sich durch papierchromatographische Untersuchungen nachweisen ließ). Aufschlußreich sind die Ergebnisse der Hg-Bestimmung: Im Harn, der in der ersten Stunde nach der Salyrganinjektion gesammelt worden war, betrug die Hg-Konzentration im Mittel 0,038% ($n = 5$), in der gereinigten, acetongefällten Fraktion 3,2—15,1%, im Mittel 7,5% ($n = 5$). Eine Umfällung der Präparate durch Lösen in Wasser und Zusatz von Aceton oder Äthylalkohol führte nicht zu reineren Produkten.

Papierchromatographische Trennung der Harnausscheidungsprodukte. Für die Auftrennung dieser organischen Hg-Verbindungen des Harns sind neutrale oder alkalische Lösungsmittelgemische erforderlich. Wie in Vorversuchen festgestellt werden konnte, führt die Anwendung von Säuren zum Zerfall der Verbindungen. Von den alkalischen Steigflüssigkeiten zeigte ein Aceton- oder Propanol-(1)-Gemisch mit Ammoniak die günstigsten Eigenschaften. Abhängig von der Zeit, in der die Harnprobe gesammelt worden war, ließen sich bis zu 5 Fraktionen auftrennen und mit Dithizon als Hg-Verbindungen nachweisen.

In normalem Harn wurde unter diesen Bedingungen in keinem Falle eine Färbung mit Dithizon beobachtet, die zur Vortäuschung von Hg hätte Anlaß geben können. Wegen der begrenzten Spezifität des Hg-Nachweises mit Dithizon wurden trotzdem Kontrollen mit dem empfindlichen Kupferjodid-Reagens ausgeführt. Die Ergebnisse deckten sich mit denjenigen des Dithizons. Gegen die regelmäßige Anwendung der Kupferjodid-Methode zum Hg-Nachweis spricht die rasche gelbbraune Verfärbung der Chromatogramme, in der die orangeroten Flecken des Hg verschwinden.

In Tab. 2 sind die Positionskonstanten der aufgetrennten Fraktionen angegeben. Einen quantitativen Überblick über die Komponenten gestattet die Abb. 1. In ihr sind als Säulen die Hg-Mengen aufgetragen, die aus der quantitativen Bestimmung der Chromatogrammflecke für die Harnportionen berechnet werden konnten.

Zwischen dem Gesamt-Hg der Harnprobe und der Summe der aufgetrennten Hg-Fraktionen läßt sich in fast allen Fällen eine wesentliche Differenz entdecken. Sie beträgt im Mittel für alle Harnproben 16%. Ihre Ursache kann teils im mangelhaften Auftrennungsverfahren und teils in Hg-Verbindungen, die sich dem Nachweis entziehen, gesucht werden.

Aus Abb. 1 ist fernerhin zu entnehmen, daß in der 24 Stunden-Hg-Bilanz 2 Fraktionen vorherrschen. Die übrigen Verbindungen treten mengenmäßig weit zurück. Die folgenden Abschnitte enthalten Untersuchungen, die der Strukturaufklärung dieser zwei größten Komponenten (Fraktion 1 und 2) im Harn dienen sollen.

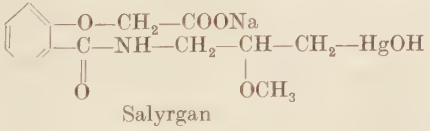
Tabelle 2. *Hg-Komponenten im frischen Harn nach Salyrgan-Injektion*

	Aceton: NH_3 P_{const}	Hg Dithizon	—SH nach KCN	Ninhydrin	UV-Absorption
Harnfraktion 1 . .	100	+	—	—	289 nm
Harnfraktion 2 . .	54	+	+	+ (gelbraun)	289 nm
Harnfraktion 3 . .	34—37	+	+	1	1
Harnfraktion 4 . .	21—23	+	+	1	1
Harnfraktion 5 . .	0— 4	+	(+)[1]	1	1
Salyrgan	100	+	—	—	289 nm
Salyrgan-L(+)-Cystein	54	+	+	+ (gelbbraun)	289 nm

$$P_{const} = \frac{\text{Entfernung des Fleckes vom Startpunkt} \times 100}{\text{Entfernung des Salyrgans (Vergleichssubstanz) vom Startpunkt}}$$

[1] Ungewiß wegen zu geringer Konzentration.

Identifizierung der Fraktionen 1 und 2. Die Untersuchung der Salyrganausscheidungsprodukte setzt Methoden voraus, mit denen der Nachweis des unveränderten Salyrganmoleküls möglich ist. Geeignet sind dafür die Wanderungsgeschwindigkeit auf dem Papierchromatogramm, der Nachweis des Hg und des Benzolkernes im Salyrgan. Die beiden zuletzt genannten Besonderheiten des Moleküls — Hg-Atom und der Benzolkern des Salicylsäurerestes — schließen durch ihre endständige Lage im Salyrgan das Molekül gleichsam zwischen sich ein. Unter der Voraussetzung, daß die Bindung der beiden Seitenketten im Salyrgan ($-OCH_3$ und $-OCH_2COOH$) sehr stabil ist, kann beim gleichzeitigen Vorliegen aller Kriterien auf das unveränderte Salyrgan geschlossen werden.



Salyrgan

Die R_f-Werte und Positionskonstanten des Salyrgans sind für mehrere Lösungsmittelgemische in Tab. 3 zusammengestellt.

Für den Nachweis des Salicylsäurerestes im Salyrgan fanden sich keine Farbreaktionen mit ausreichender Empfindlichkeit. Salyrgan zeigt jedoch im UV-Bereich eine charakteristische Absorptionsbande bei

289 nm. Sie kann dem Benzolkern (B-Bande) im Salicylsäurerest zugeordnet werden. Der Extinktionskoeffizient stimmt mit dem der vergleichsweise untersuchten Salicylsäure überein. Die geringe Verschiebung zur kurzwelligen Seite kann mit parachromen Effekten durch die Substituenten der Carboxyl- und Hydroxylgruppe gedeutet werden. Das Hg stört die Absorption in diesem Spektralbereich nicht. Abb. 2 zeigt das UV-Spektrum des Salyrgans, der Salicylsäure und der Harnfraktionen 1 und 2.

Die Tab. 2 gestattet den Vergleich der Harnfraktionen mit den Eigenschaften des Salyrgans. Von den 5 Komponenten zeigt die am schnellsten wandernde (Fraktion 1) Übereinstimmung mit dem unveränderten Molekül. Die Identität ließ sich sowohl in weiteren — in Tab. 1 genannten — Steigflüssigkeiten als auch nach Mischung des Ansatzes mit Salyrgan bestätigen. Bei der Mischung zeigte sich eine Fleckverstärkung, aber kein neuer Fleck.

Tabelle 3. *R_f-Werte und Positionskonstanten von den Harnfraktionen 1 und 2 im Vergleich mit synthetischen Salyrganverbindungen und Cystein und Cystin*

	A Aceton: NH_3 P_{const}[3]	B Pyridin : Wasser R_f	C sek.Butanol: Ameisensäure: Wasser ohne H_2S R_f	D sek. Butanol: Ameisensäure: Wasser mit H_2S R_f	E Äthylalkohol: Wasser N_2 R_f
Harnfraktion 1 . . .	100	0,64	0,93	[1]	0,12
Salyrgan	100	0,64	0,93	[1]	0,12
Harnfraktion 2 . . .	54	0,54	0,04	[2]	0,13
Salyrgan-L(+)-Cystein	54	0,54	0,05	[2]	0,12
Salyrgan-L(—)-Cystin	54	0,54	0,05	[2]	0,12
L(+)-Cystein	37[4]	[4]	0,48	0,26	0,28
L(—)-Cystin	23	0	0	0	0

[1] In HgS.
[2] Im wesentlichen in HgS und Cystein.
[3] P_{const} = siehe Tab. 2.
[4] Schwanzbildung.

Die im Harn anzutreffenden Mengen an unverändertem Salyrgan (Abb. 1) sind gering und liegen weit hinter der Fraktion 2 zurück. Diese Komponente, die sich analog dem Salyrgan durch den Hg-Gehalt und die Absorption bei 289 nm (Abb. 2) auszeichnet, besitzt eine langsamere Wanderungsgeschwindigkeit (Tab. 2). Hg-Gehalt und Absorption bei 289 nm lassen auf einen Abkömmling des Salyrgans schließen. Um die Eigenschaften dieser Substanz kennenzulernen, wurde auf dem Chromatogramm die Prüfung auf verschiedene funktionelle Atomgruppierungen vorgenommen. Dabei ließ sich feststellen, daß diese Substanz nach Behandlung mit KCN eine positive Reaktion auf SH-Gruppen mit Natriumnitroprussid und eine gelbbraune Färbung mit Ninhydrin gab.

Mit Natriumnitroprussid reagieren fast ausschließlich nur freie Sulfhydrylgruppen. Sind diese Gruppierungen gebunden, so können sie in vielen Fällen durch Behandlung mit Alkalien, Cyaniden, Sulfiten, Sulfiden oder H_2S freigelegt werden und nunmehr mit Natriumnitroprussid reagieren. Auch aus leicht spaltbaren Hg-Mercaptiden gelingt es nach eigenen Erfahrungen, mit KCN die SH-Gruppe für Natriumnitroprussid reaktionsfähig zu machen.

Nach diesen Voruntersuchungen konnte die Fraktion 2 im Harn ein Mercaptid des Salyrgans mit einer Verbindung sein, die eine ninhydrinpositive Aminogruppe enthält. Der Substanzfleck aus dem Harn wurde

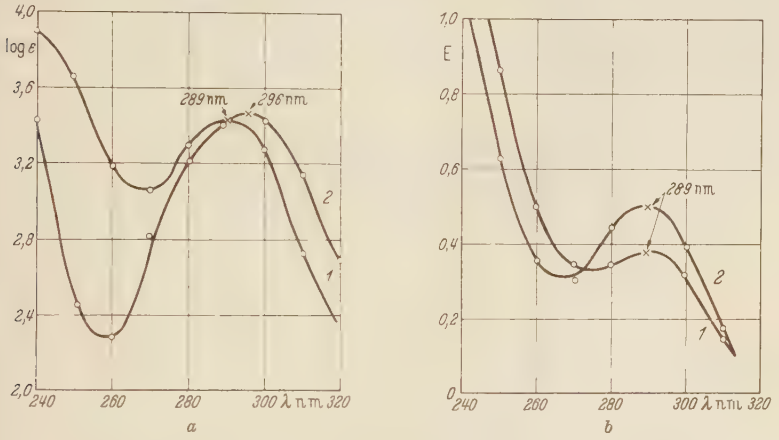


Abb. 2a. Absorptionsspektren von Salyrgan (1) und Salicylsäure (2) (in Wasser)
Abb. 2b. Absorptionsspektren der Harnfraktionen 1 und 2 nach teilweiser Reinigung (in Wasser)

deshalb mit Salyrganmercaptiden bekannter schwefel- und stickstoffhaltiger Verbindungen papierchromatographisch verglichen. Lediglich eine Verbindung des Salyrgans mit Cystein bzw. Cystin, die wegen ihres gelbbraunen Ninhydrinfleckes bereits in die engere Wahl gezogen worden war, zeigte gleiches Verhalten wie die Substanz aus dem Harn. In Tab. 4 sind die gefundenen Positionskonstanten für die einzelnen Verbindungen angegeben, die auf einem Chromatogramm entwickelt wurden.

Wenn anhand der chromatographischen Wanderungswerte in verschiedenen Lösungsmittelgemischen und der Farbreaktionen für funktionelle Gruppen die Identität der Fraktion 2 mit dem Salyrgan-Cystein bzw. -Cystin eine gewisse Wahrscheinlichkeit erhalten konnte, so war doch die Anwendung eines möglichst spezifischen Nachweises für diese beiden Aminosäuren wünschenswert. Dieser Beweis wurde durch die papierchromatographische Isolierung des Cysteins nach Spaltung des Salyrganmercaptides geführt.

Es ist bekannt, daß die Kohlenstoff-Hg-Bindung im Salyrgan in saurer Lösung instabil wird (Möller III). Auch in eigenen Voruntersuchungen konnte die Zerlegung der Ausscheidungsprodukte des

Salyrgans im angesäuerten Harn in niedermolekulare Hg-Verbindungen papierchromatographisch beobachtet werden. Bei Zimmertemperatur spaltet sich im Laufe von Stunden neben anderen unbekannten Verbindungen das Hg-Salz des mit dem Salyrgan reagierenden Thiols ab. Aus dieser Bindung läßt sich das Hg durch H_2S freisetzen (Neuberg u. Kerb) und der organische Rest papierchromatographisch in verschiedenen Lösungsmittelgemischen als Cystein nachweisen (Tab. 3). Die Entwicklung muß zum Schutze des Cysteins unter N_2- oder H_2S-Atmosphäre erfolgen. Bemerkenswert ist, daß das synthetische Salyrgan-Cystein ein völlig gleichartiges Verhalten zeigt. Auch beim Zusatz von Salyrgan-Cystein zum sauren Salyrganharn bildet sich lediglich eine Fleckverstärkung aus.

Tabelle 4. *Papierchromatographischer Vergleich verschiedener Salyrganmercaptide*

Hg-Verbindungen bei der Reaktion von Salyrgan in alkalischem Milieu mit	Aceton: NH_3 P_{const} [2]	Hg (Dithizon)	—SH (nach KCN)
Glutathion	2—5[1]	+	+
Ergothionein . . .	a) 5	+	—
	b) 42	+	—
Cysteinamin . . .	268	+	+
L(+)-Cystein . .	54	+	+
L(—)-Cystin . . .	54	+	+

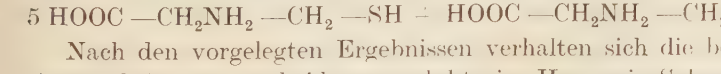
[1] Geringe Schwanzbildung.
[2] P_{const} = siehe Tab. 2.

Nach Müting werden täglich mit dem Harn 36—92 mg (im Mittel 62 mg) freies Cystin und 77—154 mg (im Mittel 110 mg) peptidgebundenes Cystin ausgeschieden. Um eine Täuschung durch diesen natürlichen Aminosäuregehalt zu verhindern, wurden leere Harnproben der Versuchspersonen aus der Zeit unmittelbar vor der Salyrganinjektion unter gleichen Bedingungen geprüft. In 2 von 10 Proben ließ sich eine Spur Cystein, das durch die intensive H_2S-Einwirkung entstanden sein kann, entdecken. Diese Mengen standen jedoch in keinem Verhältnis zu den Ausbeuten im Salyrganharn. Der normale Cystingehalt des Normalharns liegt in der Regel unter der Empfindlichkeitsschwelle bei der angewendeten chromatographischen Methode. Gegen eine fehlerhafte Beeinträchtigung durch diesen normalen Cystingehalt spricht fernerhin, daß sich die Wanderungsgeschwindigkeiten des Cysteins bzw. Cystins von denen des Salyrgan-Cysteins bzw. der Harnfraktion 2 unterscheiden.

Aus den bisher beschriebenen Nachweismethoden von Cystein und Cystin ist nicht ohne weiteres auf das Vorliegen entweder der einen oder der anderen Aminosäure zu schließen. Als Folge der kräftigen H_2S-Behandlung im sauren Harn kann ein Übergang von Cystin in Cystein stattfinden, so daß am Ende der Aufarbeitung das natürliche Produkt verschwunden sein kann. Zur Entscheidung dieser Frage wurden die Salyrganverbindungen der beiden Aminosäuren präpariert und mit der Harnfraktion 2 verglichen.

Im Salyrgan-L(+)-Cystein beträgt das molare Verhältnis der Komponenten 1:1. Die Zusammensetzung wurde auf papierchromatographischem Wege ermittelt, in dem bei der Darstellung die Partner in verschiedenen molaren Verhältnissen zusammengegeben wurden und ihr Verbleib kontrolliert wurde. Die Identifizierung erfolgte mit den beschriebenen Methoden. Neben Salyrgan-Cystein (1:1) bilden sich weitere drei recht schwache Fraktionen (Tab. 5). Alle drei sind S- und Hg-enthaltende Substanzen. Das Verhältnis der Reaktionsprodukte zueinander verschiebt sich mit abnehmender Wasserstoffionenkonzentration zugunsten des Salyrgan-Cysteins (1:1).

Beim Versuch die Salyrgan-Cystin-Verbindung zu präparieren entstand ein Komplex, der im molaren Verhältnis Salyrgan: Cystin = $1:{}^1/_2$ die günstigste Ausbeute zeigte und in seinen chromatographischen und färberischen Eigenschaften mit demjenigen des Salyrgan-Cysteins (1:1) übereinstimmte (Tab. 3). Um festzustellen, ob eine echte Identität der beiden Verbindungen besteht, wurden sie unter Bedingungen gespalten und chromatographiert, die zu keiner Umwandlung des Cystins in Cystein führt. In einem stark sauren Lösungsmittelgemisch unter H_2S-Atmosphäre reagieren die Salyrganverbindungen während der papierchromatographischen Auftrennung mit H_2S. Die Atmosphäre schützt dabei Cystein vor der Oxydation, reicht dagegen nicht zur Reduktion des Cystins aus. Beim Vergleich mit beiden Aminosäuren ergab sich, daß sowohl aus Salyrgan-Cystein (1:1) als auch aus Salyrgan-Cystin ($1:{}^1/_2$) Cystein abgetrennt werden kann (Tab. 3, D). Aus diesem Versuch und den färberischen und chromatographischen Eigenschaften der Verbindung kann geschlossen werden, daß bei der Reaktion von Salyrgan mit Cystin im wesentlichen Salyrgan-Cystein entsteht. Eine Bestätigung dieser Annahme findet sich in Untersuchungen von Preisler u. Preisler, Andrews u. Wyman und Simonsen an analogen Disulfiddicarbonsäuren. Danach tritt bei der Einwirkung von Hg-Verbindungen auf diese Säuren eine Disproportionierung in Mercaptid und Sulfonat ein. Die Umsetzung verläuft nach folgender Gleichung (Blackburn u. Challenger, Challenger u. Rawlings):



Nach den vorgelegten Ergebnissen verhalten sich die beiden wichtigsten Salyrganausscheidungsprodukte im Harn wie Salyrgan-Cystein und unverändertes Salyrgan. Die Ausscheidung des Mercaptids erfolgt hauptsächlich in der ersten Stunde nach der Injektion des Salyrgans und ist in der Regel mit der 3. Std abgeschlossen (Abb. 1). Salyrgan

Tabelle 5. *Nebenfraktionen bei der Präparation von Salyrganmercaptiden.* Lösungsmittelgemische A (Tab. 4)

Nebenfraktion	Salyrgan-L(+)-Cystein P_{const} [1]	„Salyrgan-L(—)-Cystin" P_{const} [1]
1	145	145
2	34	34
3	18	(18)

[1] P_{const} = siehe Tab. 2.

findet sich dagegen noch nach 8 Std im Harn mit einem Maximum in der 2. Std. Von besonderem Interesse ist es, die Ausscheidung dieser Substanzen mit der Diurese in Verbindung zu setzen. Seit Saxl u. Heilig ist bekannt, daß die Harnflut mit einer zeitlichen Verzögerung hinter der Hg-Ausscheidung folgt. Nachdem etwa 30% der am ersten Tage ausgeschiedenen Hg-Menge die Niere bereits passiert haben (innerhalb 45 bis 60 min nach der Injektion), setzt die Diurese ein. Aus den Bestimmungen des Hg auf dem Chromatogramm (Abb. 1) ist ohne weiteres zu ersehen, daß die Hg-Ausscheidung vor der Diurese praktisch vom Salyrgan-Cystein bestritten wird. Mit der Diurese nahezu parallel läuft dagegen die geringe Salyrganausscheidung.

Aus der bisherigen Mitteilung ist nicht zu entnehmen, ob das Salyrgan-Cystein ein echtes Ausscheidungsprodukt neben dem freien Salyrgan ist oder ob die Mercaptidbildung auf Grund der Reaktionsmöglichkeiten im Harn erfolgt. Zur Klärung dieser Frage wurde Normalharn mit Salyrgan versetzt und bei 37° C inkubiert. Die Salyrgankonzentration war so gewählt, daß sie den Ausscheidungsverhältnissen nach i.v. Injektion entsprach. Nach 1stündiger Inkubation entstand in 6 Versuchen höchstens 260 μg Salyrgan-Cystein (1 : 1)/ml Harn. Im Mittel reagierten 6% des zugesetzten Salyrgans mit SH-Gruppen, während in vivo am Ende der ersten Stunde nach der Injektion etwa 80% als Salyrgan-Cystein im Harn vorliegen (Abb. 1). Der Ort der Mercaptidbildung wird demnach in Abschnitten des Organismus zu suchen sein, in denen die Bindung des Hg erhebliches toxikologisches und pharmakologisches Interesse für den Wirkungsablauf besitzt.

Die Reaktionsfreudigkeit des Hg und seiner Verbindungen mit Sulfhydrylgruppen wird seit längerer Zeit zur Deutung der Wirkung im Organismus und andererseits auch zur Behandlung der Hg-Vergiftung herangezogen (Walker; Eagle; Barron u. Singer; Singer u. Barron; Stocken u. Thompson; Long u. Farah; Handley u. Laforge; Maresh u. Farah). Eine wichtige Ergänzung dieser Beziehungen des Hg zu SH-Gruppen im Organismus haben die Untersuchungen von Barron u. Kalnitzky, Handley I und Handley und Slavik gebracht. In der Niere und im Herz wird die Bernsteinsäure-Dehydrogenase, ein Ferment der Endoxydation der Brenztraubensäure mit funktionswichtigen SH-Gruppen, durch organische Hg-Verbindungen gehemmt.

Die Ausscheidung des Salyrgans als Cystein-Verbindung bedeutet eine weitere Bestätigung, daß im Organismus trotz Vielzahl der Reaktionsmöglichkeiten für Hg die SH-Gruppe und ganz besonders das Cystein eine Sonderstellung einnimmt. Inwieweit die Verbindung des Salyrgans mit Cystein unmittelbar für den Diurescablauf bedeutungsvoll ist, bedarf weiterer Klärung.

Summary

After intravenous injection of Mersalyl, up to five Hg-compounds could be separated from the human urine by means of paper chromatography.

The excretion of these substances was studied in their temporal order by quantitative analysis of the mercury in the spots obtained by chromatography. It could be shown that the two largest fractions behaved like Mersalyl-L(+)-cysteine (1:1) and like unchanged Mersalyl.

Identification of the Mersalyl was possible by paper chromatography, by determination of the mercury, and by spectrophotometric identification of the benzene ring. The composition of the Mersalyl-cysteine was determined by comparative experiments with synthetic Mersalyl-cysteine and by identification of the separated amino acid.

Herrn Prof. Dr. F. Heim danke ich für die Förderung und Diskussion der Arbeit. Salyrgan (theophyllinfrei) wurde freundlicherweise von den Farbwerken Hoechst A.G., Frankfurt(M)-Hoechst, zur Verfügung gestellt.

Literatur

Andrews, J. C., and P. D. Wyman: J. of Biol. Chem. **87**, 427 (1930). — Barron, E. S. G., and G. Kalnitzky: Biochemic. J. **41**, 346 (1947). — Barron, E. S. G., and T. P. Singer: J. of Biol. Chem. **157**, 221 (1945). — Blackburn, S., and F. Challenger: J. Chem. Soc. (Lond.) **1938**, 1872. — Burch, G., T. Ray, S. Threefoot, J. Kelly and A. Svedberg: J. Clin. Invest. **29**, 1131 (1950). — Challenger, F., and A. Rawlings: J. Chem. Soc. (Lond.) **1937**, 868. — Eagle, H.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **66**, 436 (1939). — Farah, A., and G. Maresh: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **92**, 73 (1948). — Griffini, A. M., e G. Gerosa: Med. Lav. **45**, 695 (1954). — Handley, C. A.: Federat. Proc. **8**, 299 (1949) (I), in A. Drill, Pharmacology in Medicine, 1954, 39/13 (II), XX. Intern. Kongreß f. Physiology, Brüssel, 1956 (III). — Handley, C. A., and M. Laforge: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **65**, 74 (1947). — Handley, C. A., and P. S. Slavik: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **100**, 115 (1950). — Long, W., and A. Farah: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **88**, 388 (1946). — Möller, K. O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **148**, 67 (1930) (I); **148**, 81 (1930) (II); **153**, 109 (1930) (III). — Müting, D.: Hoppe-Seylers Z. **297**, 61 (1954). — Neuberg, C., u. J. Kerb: Biochem. Z. **40**, 498 (1912). — Preisler, P. W., and D. B. Preisler: J. of Biol. Chem. **95**, 181 (1932). — Sanl, P., u. R. Heilig: Z. exper. Med. **38**, 94 (1923). — Simonsen, D. G.: J. of Biol. Chem. **94**, 323 (1931). — Singer, T. P., and E. S. G. Barron: J. of Biol. Chem. **157**, 241 (1945). — Stocken, L. A., and R. H. S. Thompson: Physiologic. Rev. **29**, 168 (1949). — Toennies, G., and J. I. Kolb: Analyt. Chemistry **23**, 823 (1951). Walker, E.: J. of Biochem. **92**, 292 (1928).

Dr. F. Leuschner, Pharmakologisches Inst. d. Univ. Erlangen

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 524—537 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Die Retention der Lithium-Ionen bei Störungen des Salz- und Wasserhaushaltes*

Von
H. Herken, G. Senft und H. Wilutzky

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. März 1957)

Bei den Untersuchungen über die hormonalen Ursachen der Therapieresistenz von Ödemkrankheiten zeigte sich, daß die Wirkung der Diuretica bei den stark natriumretinierenden Fällen viel geringer war als bei Patienten mit ausgeglichener Bilanz. Das Ausmaß der Natriumretention bei definierter natriumarmer Diät konnte daher zur Beurteilung des Schweregrades von Ödemkrankheiten herangezogen werden (H. Herken, 1956). Da die Aufstellung von Natriumbilanzen im klinischen Versuch umständlich ist, wurde geprüft, ob die Ausscheidung des oral zugeführten Lithium-Ions, das im menschlichen Organismus nur in Spuren vorhanden ist, zur Beurteilung der Retentionstendenz des ödemkranken Organismus verwandt werden kann. Nach alten Untersuchungen von E. Overton (1902) soll sich das Lithium-Ion unter bestimmten Bedingungen wie Natrium verhalten. In natriumfreien Frosch-Ringer-Lösungen konnten nur Lithiumsalze die Erregbarkeit des Froschmuskels erhalten oder wiederherstellen. Diese Beobachtung über eine gewisse physiologische Äquivalenz am isolierten Organ ließ sich aber nicht auf den gesamten Organismus übertragen, wie spätere Arbeiten ergeben haben. Overton selbst hat schon darauf hingewiesen, daß „etwas höhere Konzentrationen auf die Muskeln und noch mehr auf die Nerven schädigend wirken". Bei Versuchen, das Natrium in der Diät durch Lithium zu ersetzen, kam es bei chronischer Verabreichung zu schweren Intoxikationen, die auf eine steigende Retention dieses Kations im Organismus zurückgeführt wurden (Radomski u. Mitarb., 1950). Unter diesen Bedingungen sind Lithium und Natrium physiologisch sicher nicht gleichwertig.

Eigene Beobachtungen über die Ausscheidung des Lithium-Ions bei gesunden Versuchspersonen ergaben nach einmaliger oraler Verabreichung eine nahezu quantitative Ausscheidung im Harn innerhalb von 4 Tagen. Im Gegensatz dazu fanden sich deutliche Retentionen bei Ödemkranken, die uns zur Untersuchung der Ursachen veranlaßten.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Methodik

Die Bestimmung der Kationen erfolgte in allen Fällen mit dem Beckman-Spektrophotometer, Modell DU, das mit einem Zusatzgerät zur Flammenphotometrie sowie einem Sekundär-Elektronen-Vervielfältiger ausgestattet war. Die quantitative Analyse der Lithium-Ionen erfolgte bei einer Wellenlänge von 672 mμ. Unter Einschaltung des Multipliers konnte mit Hilfe des Empfindlichkeitsreglers bei einer Spaltbreite von 0,02 mm eine maximale Empfindlichkeit erreicht werden. Die Wellenlänge von 672 mμ liegt allerdings an der Grenze des spektralen Bereiches, in dem die Meßgenauigkeit durch den Sekundär-Elektronen-Vervielfältiger noch gesteigert werden kann. Vergleichende Messungen ohne Multiplier zeigten jedoch, daß zur Erzielung gleicher Empfindlichkeiten eine 7fach größere Spaltbreite benutzt werden mußte.

Weiter wurde geprüft, ob die Exaktheit der flammenphotometrischen Auswertung durch eine gegenseitige Beeinflussung der Emissionsspektren von Na, K und Li gestört wird. Aus diesem Grunde wurden folgende Eichlösungen hergestellt.

Tabelle 1. *Zusammensetzung der Eichlösungen*

Zahlenangaben in γ/ml

A)	0 1 3 5 7 9	Lithium
B)	0 1 3 5 7 9	Lithium + 15 K
C)	0 1 3 5 7 9	Lithium + 15 K + 10 Na
D)	0 1 3 5 7 9	Lithium + 15 K + 40 Na
E)	0 1 3 5 7 9	Lithium + 15 K + 100 Na

Der Vergleich der Meßreihen *A* und *B* ergab, daß die Anwesenheit von K-Ionen die Bestimmung des Lithiums nicht stört. Der Verlauf beider Eichkurven wurde auch durch Zusatz von Na in einer Konzentration von 10—100 γ/ml (*C*, *D* und *E*) nicht geändert.

Die flammenphotometrische Analyse der K-Ionen wurde ohne Verstärker bei einer Wellenlänge von 769 mμ und einer Spaltbreite von 0,05 mm durchgeführt. Lithium- und Natrium-Ionen störten die Messungen nicht.

Die Bestimmung der Natrium-Ionen erfolgte bei einer Wellenlänge von 589 mμ und einer Spaltbreite von 0,01 mm unter Einschaltung des Multipliers zur Erreichung der höchsten Empfindlichkeit. Lithium und K-Ionen bewirkten keine Änderung des Verlaufes der Eichkurven.

Ergebnisse

12 gesunde, kochsalzreich ernährte Versuchspersonen (Diät 250 bis 300 mval/Na je Tag) schieden nach einmaliger oraler Gabe von 500 mg Lithiumchlorid, die einer Menge von 11,8 mval Lithium entspricht, in den ersten 24 Std 6,5 mval = 55%, innerhalb von 4 Tagen 10,84 mval = 91,7% des verabreichten Lithiums im Harn aus. Bei Reduktion des Kochsalzes in der Diät auf 30 mval täglich erniedrigte sich die Lithiumausscheidung am ersten Tag auf 5,3 mval = 44,8% der Einfuhr. Während der 4tägigen Versuchsdauer wurden im Harn 9,42 mval = 79,8% des Salzes eliminiert. Bei 10 ödemkranken Patienten unter gleicher natriumarmer Diät konnten am ersten Tag nur 2,8 mval = 23,8%, in 4 Tagen 6,56 mval = 55,7% der zugeführten Lithiummenge im Urin wiedergefunden werden. Ein gewisser Einfluß des Natriumgehaltes der Diät auf

die Lithiumausscheidung ist erkennbar, doch wird die sehr viel stärkere Retention bei den Ödemkranken hierdurch nicht geklärt. Statistisch gesicherte Unterschiede der Lithiumausscheidung bei kochsalzarmer Ernährung ergaben sich zwischen den Versuchspersonen und Patienten am 1. Tag nach der oralen Applikation und in der 4tägigen Gesamtperiode, so daß beide Zeitabschnitte zur Feststellung der Differenzen im klinischen Versuch benutzt werden können (Tab. 2).

Zur Aufklärung der Ursachen, die diese Retention des Lithium-Ions im ödemkranken Organismus bewirken, wurden orale Dauerinfusionen mit Salzlösungen verschiedener Zusammensetzung in der früher von uns beschriebenen Versuchsanordnung durchgeführt (H. Herken, G. Senft u. H. Wilutzky, 1956). Hierbei kam es zunächst darauf an, den Einfluß der Natriumionen auf die Lithiumausscheidung zu studieren.

Albinoratten mit einem Durchschnittsgewicht von 220 g ($\sigma \pm 23$, Gruppe A) erhielten im Verlauf von 24 Std durch eine Magensonde 48 ml einer Lösung, die pro ml 138,6 μval Na und 15,4 μval Lithium enthielt. In diesem Fall waren 10% der isotonischen Kochsalzlösung durch Lithiumchlorid ersetzt. In einer anderen Versuchsreihe bekamen die Tiere unter gleichen Bedingungen 48 ml einer hypotonen Lösung mit 15,4 μval Lithium/ml, die kein Natrium enthielt. In beiden Versuchsgruppen betrug die gesamte Lithiumeinfuhr 739,2 μval. Bei Anwesenheit von Natrium wurden hiervon 494,7 μval in 24 Std ausgeschieden. Das entspricht einer Menge von 66,9% der Einfuhr. Nach der Infusion der kochsalzfreien hypotonen Lithiumchloridlösung erschienen im gleichen Zeitraum nur 259,6 μval Lithium im Harn = 35,1% der Einfuhr. Die Lithiumausscheidung betrug in diesem Falle nur 52,2% der Versuchsreihe, die bei gleicher Flüssigkeits- und Lithiummenge zusätzlich 6652,8 μval Na/Tier erhielt. Die Versuchsergebnisse bestätigen den von Radomski u. Mitarb. beschriebenen Einfluß der Natrium-Ionen auf den Stoffwechsel des Lithiums im tierischen Organismus (Tab. 3).

Der Vergleich mit der Natrium-Ausscheidung im Urin von Ratten, die eine natriumfreie Lithiumchloridlösung bzw. destilliertes Wasser erhielten, zeigte, daß der Zusatz von Lithium-Ionen die Natriumausscheidung unter diesen Bedingungen steigert. Sie wird von 118 μval auf 483 μval während des 24stündigen Versuches erhöht. Bei Infusionsversuchen mit Lösungen, die 138,6 μval Na/ml bzw. 138,6 Na/ml und 15,4 μval Lithium/ml enthielten, konnten dagegen Unterschiede in der Natriumausscheidung nicht festgestellt werden (Tab. 4).

Die Befunde über eine unter bestimmten Voraussetzungen auftretende natriuretische Wirkung des Lithium-Ions stehen in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Radomski, Fuyat, Nelson u. Smith (1950), die eine Vermehrung der Natriumausscheidung im Urin von kochsalzarm ernährten Hunden bei täglicher Applikation von 20—50 mg Lithiumchlorid/kg Körpergewicht im chronischen Versuch beobachteten. Bei Hunden, die eine kochsalzreiche Diät erhielten, traten erst

Tabelle 2. *Lithiumausscheidung nach einmaliger oraler Gabe von 500 mg LiCl bei gesunden, kochsalzreich und kochsalzarm ernährten Versuchspersonen und bei Ödemkranken mit kochsalzarmer Diät nach einmaliger oraler Gabe von 500 mg LiCl*
(11,8 mval Lithium)

	I Gesunde, kochsalzreich ernährte Versuchspersonen (Natriumgehalt der Diät 250—300 m val)		II Gesunde, kochsalzarm ernährte Versuchspersonen (Natriumgehalt der Diät 30 m val)		III Ödemkranke, kochsalzarm ernährte Patienten (Natriumgehalt der Diät 30 m val)	
	Li-Ausscheidung in mval	Li-Ausscheidung in Prozent der Einfuhr	Li-Ausscheidung in mval	Li-Ausscheidung in Prozent der Einfuhr	Li-Ausscheidung in mval	Li-Ausscheidung in Prozent der Einfuhr
1. Tag	6,50	55,0	5,30	44,8	2,80	23,8
$\sigma \pm$	0,46	3,1	1,75	12,1	0.90	6,41
n	12		7		10	
p	→ 0,05 ←		→	0,0027 ←		
	→ 0,0002 ←					
2. Tag	2,54	21,4	2,30	19,6	1,90	16,2
$\sigma \pm$	0,20	1,25	0,38	2,7	0,66	4,09
n	12		7		10	
3. Tag	1,26	10,2	1,00	8,5	1,10	9,3
$\sigma \pm$	0,21	1,32	0,54	4,2	0,33	2,22
n	12		7		10	
4. Tag	0,60	5,1	0,82	6,9	0,76	6,4
$\sigma \pm$	0,12	0,78	0,17	1,2	0,29	2,02
n	12		5		10	
1.—4. Tag	10,84	91,7	8,92	79,8	6,56	55,7
$\sigma \pm$	0,33		0,91		1,02	
n	12		5		10	
	→ 0,0005 ←		→	0,0005 ←		
p	→ 0,0002 ←					

1. Tag	I : II	$p = > 0{,}05$	II : III	$p = 0{,}0027$
1.—4. Tag	I : II	$p = < 0{,}0005$	II : III	$p = 0{,}0005$

Tabelle 3. *Flüssigkeits-, Natrium- und Lithiumausscheidung von Ratten der Gruppe A bei Infusion natriumfreier und natriumhaltiger Lithiumchloridlösung*
(Methode H. Herken, G. Senft u. H. Wilutzky)

	Flüssigkeit/ml		Natrium/μval		Lithium/μval	
	Isotone NaCl-LiCl-Lösung 138,6 μval Na/ml 15,4 μval Li/ml	Hypotone Natriumfreie LiCl-Lösung 15,4 μval Li/ml	Isotone NaCl-LiCl-Lösung 138,6 μval Na/ml 15,4 μval Li/ml	Hypotone Natriumfreie LiCl-Lösung 15,4 μval Li/ml	Isotone NaCl-LiCl-Lösung 138,6 μval Na/ml 15,4 μval Li/ml	Hypotone Natriumfreie LiCl-Lösung 15,4 μval Li/ml
Gesamteinfuhr	48,0	48,0	6652,8	—	739,2	739,2
Extrarenale Flüssigkeitsverl.	17,0	17,0	—	—	—	—
Einfuhr nach Abzug der extrarenalen Flüssigkeitsverluste	31,0	31,0	6652,8	—	739,2	739,2
Arithmetisches Mittel der Harnausscheidung	29,7	38,7	4613,2	118,52	494,7	259,6
Standardabweichung $\sigma \pm$.	7,4	4,9	1410,0	47,20	184,0	72,5
Anzahl der Versuche	7	8	7	8	7	8
p					0,01	
Li-Ausscheidung in Prozent der Einfuhr					66,9	35,1

Tabelle 4. *Flüssigkeits- und Natriumausscheidung von Ratten der Gruppe A während einer 24stündigen Dauerinfusion mit verschiedenen Lösungen*

Infusionsflüssigkeit	Flüssigkeit/ml				Na/μval			
	Natriumfreie LiCl-Lösung 15,4 μval Li/ml	Dest. Wasser	NaCl-LiCl-Lösung 138,6 μval Na/ml 15,4 μval Li/ml	NaCl-Lösung 138,6 μval Na/ml	Natriumfreie LiCl-Lösung 15,4 μval Li/ml	Dest. Wasser	NaCl-LiCl-Lösung 138,6 μval Na/ml 15,4 μval Li/ml	NaCl-Lösung 138,6 μval Na/ml
Gesamteinfuhr	48,0	48,0	48,0	48,0	—	—	6652,8	6652,8
Extrarenale Flüssigkeitsverluste	17,0	17,0	17,0	17,0	—	—	—	—
Einfuhr nach Abzug d. extrarenalen Flüssigkeitsverluste	31,0	31,0	31,0	31,0	—	—	6652,8	6652,8
Arithmetisches Mittel d. Harnausscheidung . . .	28,2	38,7	29,4	28,4	483,28	118,52	4613,2	4722,34
Standardabweichung $\sigma \pm$	3,7	4,9	7,4	4,8	355,1	47,2	1410,0	1001,00
Anzahl der Versuche . . .	8	7	7	4	8	7	7	4
p					0,01			

bei täglicher Gabe von 100 mg Lithiumchlorid/kg Körpergewicht negative Natriumbilanzen auf. Da die Natriumverluste in den Versuchen Radomskis durch Injektion von Desoxycorticosteron nicht verhindert werden konnten, wurde angenommen, daß Lithium in den angegebenen Dosen eine Schädigung der Tubulusepithelien hervorruft, die eine Änderung der Ansprechbarkeit für Halocortine zur Folge hat. Für eine derartige Deutung sprechen auch die von Radomski u. Mitarb. beobachteten histologischen Veränderungen der Tubuluszellen von Hunden, die nach Verfütterung hoher Lithiumchloriddosen gestorben waren.

Die extremen Bedingungen dieser Versuche beantworten noch nicht die Frage, ob die beim ödemkranken Menschen beobachtete Lithiumretention hormonale Ursachen hat. Dies kann durch vergleichende Untersuchungen an Tieren verschiedenen Alters bei definiertem Natrium- und Lithiumgehalt der Infusionsflüssigkeit geprüft werden. Die Grundlage für derartige Experimente bilden frühere Beobachtungen, nach denen die Natrium- und Wasserausscheidung von Ratten mit zunehmendem Alter nachläßt. Bei den ältesten Versuchstieren war die Eliminationsfähigkeit für Natrium und Wasser so stark eingeschränkt, daß sich im Verlauf einer 24stündigen Dauerinfusion mit einer isotonischen Kochsalzlösung deutlich sichtbare Ödeme an den Pfoten und Schnauzen der Tiere entwickelten. Charakteristisch für diese Ödemart war eine in den ersten 6 Std des Experimentes zu beobachtende Natriumretention, der die Speicherung von Wasser in deutlichem Abstand folgte. Diese primäre Natriumretention wurde durch eine Überfunktion des Aldosterons erklärt und das beschriebene Ödem als Halocortintyp des Ödems bezeichnet (H. Herken, G. Senft u. H. Wilutzky, 1956; H. Herken, 1956; H. Herken, G. Senft u. J. Schaper, 1957).

Die Versuche wurden an Tieren der Gruppe C, bei denen sich im Verlauf der 24stündigen Infusion die stärksten Ödeme dieses Typs entwickelten, unter den gleichen Bedingungen wie bei den normal ausscheidenden Ratten der Gruppe A durchgeführt. Die Einfuhr betrug 48,0 ml Flüssigkeit, 6652,8 μval Na und 739,2 μval Lithium. Nach Abzug der extrarenalen Flüssigkeitsverluste von der Einfuhr wurden von den Tieren der Gruppe C 25,5 ml Flüssigkeit (= 83,6% der infundierten Flüssigkeitsmenge), 5746,1 μval Natrium und 219,2 μval Lithium (= 86,4% der Natrium- und 70,3% der Lithiumeinfuhr) retiniert. Der Vergleich der Lithiumausscheidung in der Gruppe C mit der von Ratten der Gruppe A zeigt, daß die Fähigkeit zur Elimination oral zugeführter Lithium-Ionen bei Tieren ohne Ödeme mehr als doppelt so groß wie die der natrium- und wasserretinierenden Ratten ist, obwohl der Natriumgehalt der Infusionsflüssigkeit in beiden Gruppen völlig gleich ist. Es muß sich daher mit großer Wahrscheinlichkeit um die Folgen hormonaler Veränderungen handeln (Abb. 1).

Auf Grund der Bilanzanalyse der ersten 6 Std des Versuches lassen sich Berechnungen anstellen, die eine Aussage über die Art der bei

diesem Ödem vorliegenden Ausscheidungsstörung zulassen. Im Verlauf von 24 Std werden ungefähr 30% der infundierten Flüssigkeit extrarenal und etwa 500 μval Na durch die Haut und im Stuhl ausgeschieden. Die Lithiumausscheidung im Kot ist minimal und praktisch zu vernachlässigen. Bei einer 6stündigen Einfuhr von 12 ml Flüssigkeit mit 1663,2 μval Natrium und 184,8 μval Lithium werden demnach 4,2 ml Flüssigkeit und 125 μval Natrium extrarenal eliminiert. Bei einer völlig ausgeglichenen Bilanz würde die renale Ausscheidung 7,8 ml Flüssigkeit, 1538,2 μval Natrium und 184,8 μval Lithium betragen. Bei Erfüllung dieser Voraussetzung könnten eine Natriumkonzentration von 197,0 μval/ml und eine Lithiumkonzentration von 23,6 μval/ml erreicht werden. Die gemessene Flüssigkeitsausscheidung während der ersten 6 Versuchsstunden betrug aber nur 1,45 ml. Bei quantitativer Elimination der eingeführten Ionen müßten in dieser Harnmenge 1538,2 μval Natrium und 184,8 μval Lithium enthalten sein. Die Natriumkonzentration des Urins würde dann 1061 μval/ml, die Lithiumkonzentration 127 μval/ml betragen. Tatsächlich werden jedoch mit den 1.45 ml Harn nur 33,0 μval Natrium und 30,9 μval Lithium ausgeschieden, da im ml durchschnittlich nur 22,7 μval Natrium und 21,2 μval Lithium enthalten sind. Die gefundene Natriumkonzentration beträgt ungefähr $^1/_{50}$ der oben errechneten Natriumkonzentration, die bei ausgeglichener Elektrolytbilanz erreicht werden kann. Die im Harn der Tiere der Gruppe C gemessene Lithiumkonzentration entspricht mit 22,7 μval /ml nur $^1/_6$ des theoretisch möglichen Wertes.

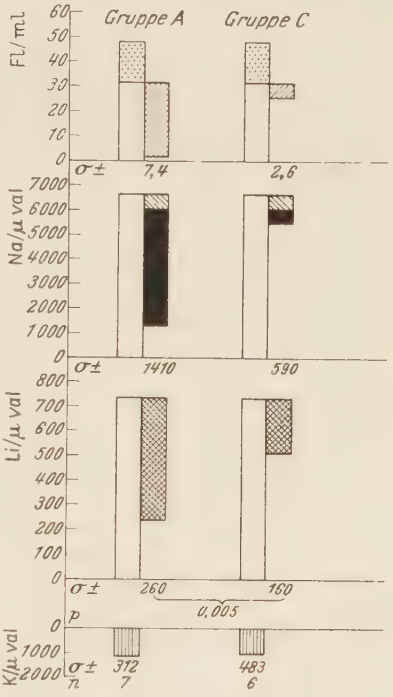


Abb. 1. Flüssigkeits-, Natrium-, Lithium- und Kaliumbilanzen von Ratten der Gruppen A und C (Halocortintyp des Ödems) während einer 24stündigen oralen Dauerinfusion mit 48 ml einer isotonischen NaCl-LiCl-Lösung (138,6 μval Na/ml, 15,4 μval Li/ml) □ Einfuhr Flüssigkeit, Natrium, Lithium ▨, Ausfuhr Flüssigkeit. □ Extrarenale Flüssigkeitsverluste, ■ Ausfuhr Natrium, ▩ Ausfuhr Lithium; ▥ Ausfuhr Kalium; ▧ Natrium, Stuhl u. Haut

Nach den in der Literatur vorliegenden Angaben werden Natrium und Lithium in gleichem Ausmaß glomerulär filtriert. Bei der tubulären Rückresorption sind jedoch Unterschiede zwischen den beiden Kationen festgestellt worden, die durch

die verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften zu erklären sind. Im Vergleich zu den Natriumionen hat Lithium einen kleineren Ionenradius, in hydratisierter Form jedoch einen größeren effektiven Durchmesser. Es besitzt einen geringeren Diffusionskoeffizienten und minimale Adsorptionseigenschaften an Proteine. Während durchschnittlich 98% des glomerulär filtrierten Natriums rückresorbiert werden, sind es beim Lithium-Ion nach den Feststellungen von Foulks, Mudge u. Gilman (1952) nur 70% der filtrierten Menge. Talso u. Clarke (1950) fanden bei ihren Clearance-Untersuchungen sogar Schwankungen zwischen 55 und 97%.

Auch die Experimente von Talso u. Clarke weisen auf eine gemeinsame hormonale Steuerung der Rückresorption von Natrium und Lithium hin. Diese Autoren stellten fest, daß der Quotient aus rückresorbierter und filtrierter Lithiummenge bei kochsalzreich ernährten Hunden kleiner ist als bei Tieren mit kochsalzarmer Diät. Dies bedeutet, daß bei konstanten glomerulären Filtrationsgrößen bei kochsalzreicher Ernährung weniger Lithium rückresorbiert wird. Luetscher (1956) konnte zeigen, daß die Intensität der tubulären Rückresorption von Natrium bei Änderung der Kochsalzzufuhr eine Folge der verminderten oder erhöhten Aldosteronausscheidung ist. Beim ödemkranken Organismus besteht infolge der erhöhten Aldosteronausschüttung eine maximale tubuläre Rückresorption des Natrium-Ions. Auf eine extrem kochsalzarme Ernährung wird der Organismus zur Wahrung seines Natriumbestandes mit einer nahezu quantitativen Rückresorption des filtrierten Natriums antworten. Dies erklärt auch die eingangs beobachtete starke Retention von Lithium-Ionen bei Infusion einer natriumfreien Lösung, deren Ursache in einer hormonalen Funktionssteigerung gesucht werden kann.

Es lassen sich aber auch Beweise dafür beibringen, daß die verminderte Lithiumausscheidung bei dem experimentellen Ödem nicht als Folge einer verstärkten passiven Diffusion des Ions durch das Tubulusepithel anzusehen ist, wie von manchen Autoren behauptet wurde. Da der Prozentsatz der Lithium- und Wasserretention (83,3 und 81,4% der Einfuhr) in der ersten Phase der Ödementwicklung ungefähr gleich war, schien es nicht völlig ausgeschlossen, daß die Retention von Lithium-Ionen auf der vermehrten Rückresorption von Wasser beruht. Gegen diese Deutung spricht die Beobachtung, daß die Minderung der Ausscheidung von Lithium-Ionen während der gesamten Versuchsdauer nicht gleichmäßig ist. Sie betrug 83,3% der Einfuhr während der ersten 6 Std des Versuches und nur 65,8% während der 7.—24. Std. Die Natriumretention verhielt sich entsprechend. Sie erniedrigte sich von 98 auf 85,2% der Zufuhr, während der Prozentsatz der Wasserretention in dem 24-stündigen Versuch ungefähr konstant blieb. (Tab. 5). Die gleichartige Verstärkung der Natrium- und Lithium-Retention weist darauf hin, daß die Ausscheidung beider Ionen der Steuerung des Aldosterons unterliegt. Aus den schon diskutierten Gründen kann eine gleich große renale Elimination beider Kationen nicht erwartet werden.

Zur weiteren Sicherung der Befunde über die Korrelation zwischen Natrium- und Lithiumausscheidung wurden Experimente an adrenalektomierten Tieren durchgeführt. Die Epinephrektomie wurde in Äthernarkose vorgenommen. Am Operationstag erhielten die Tiere 5 ml

physiologische Kochsalzlösung/100 g Körpergewicht durch eine Magensonde. Bis zur Durchführung der Infusionsversuche zwischen dem 3. und 5. Tag nach der Operation wurde das Trinkwasser durch die physiologische Salzlösung ersetzt, die spontan aufgenommen wurde.

Bei den operierten Tieren traten nach der Infusion von 48,0 ml Flüssigkeit mit 6652,8 μval Natrium und 739,2 μval Lithium starke Ödeme auf. Während des 24 stündigen Versuches wurden 24,9 ml Flüssigkeit (= 85,5% der Einfuhr), 4202,7 μval Natrium (= 63,1% der Einfuhr) und 465,4 μval Lithium (= 67,7% der Einfuhr) im Tierkörper zurückgehalten (Tab. 6).

Die bei diesen Tieren auftretenden Flüssigkeitsretentionen sind durch eine Störung des funktionellen Gleichgewichtes zwischen Neurohypophyse und Nebennieren mit nachfolgender vermehrter Ausschüttung des antidiuretischen Hormons zu erklären und als „Adiuretin-Typ" des Ödems bezeichnet worden. (H. Herken, G. Senft u. H. Wilutzky, 1956; H. Herken, 1956). Die verzögerte Wasserausscheidung nach Adrenalektomie kann als kompensatorische Gegenregulation aufgefaßt werden, mit

Tabelle 5. *Flüssigkeits-, Natrium- und Lithiumausscheidung von Ratten der Gruppe C bei Infusion einer isotonischen NaCl-Li-Lösung (138,6 μval Na/ml, 15,4 μval Li/ml) während der 1.—6. und 7.—24. Std des Versuches*

	1.—6. Versuchsstunde			7.—24. Versuchsstunde		
	Flüssigkeit/ml	Natrium μval	Lithium μval	Flüssigkeit/ml	Natrium μval	Lithium μval
Gesamteinfuhr	12,0	1663,2	184,8	36,0	4989,6	554,4
extrarenaler Flüssigkeitsverlust	4,2	—	—	12,6	—	—
Einfuhr nach Abzug des extrarenalen Flüssigkeitsverlustes	6,7	1663,2	184,8	23,4	4989,6	554,4
Arithmethisches Mittel der Harnausscheidung	1,45	33,09	30,9	4,2	737,0	188,70
Standardabweichung $\sigma \pm$	0,7	33,0	15,3	2,9	314,0	97,5
Anzahl der Versuche	7	7	7	5	5	5
Retention in Prozent der Einfuhr	81,4	98,0	83,3	82,0	85,2	65,8

deren Hilfe extreme Natriumverluste bei Fehlen der Nebennieren durch Wasserretention verhindert werden (H. Herken, G. Senft u. J. Schaper, 1957). Schon früher hatten wir durch vergleichende Bilanzanalysen festgestellt, daß die Gruppe C (Halocortintyp des Ödems) mehr Natrium als Wasser retiniert. In der Versuchstiergruppe A_0 mit entfernten Nebennieren (Adiuretin-Typ des Ödems) ist das Verhalten umgekehrt. Der Unterschied in der Natrium- und Wasserausscheidung ist während der 1.—6. Std des Versuches besonders deutlich. Mit der gleichen Versuchsanordnung wurde auch das Verhalten des Lithium-Ions geprüft (Abb. 2).

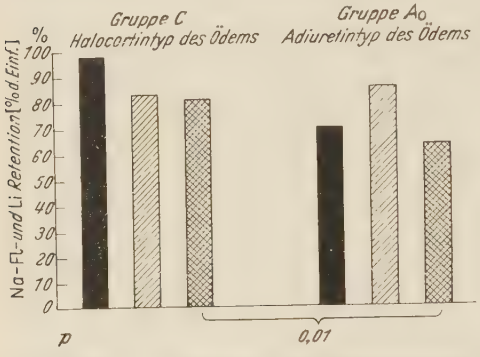


Abb. 2. Natrium-, Flüssigkeits- und Lithiumretention in Prozent der Einfuhr während der ersten 6 Std einer oralen Dauerinfusion mit 12 ml einer isotonischen NaCl-LiCl-Lösung. (138,6 µval Na/ml 15,4 µval Li/ml) bei Ratten mit dem Halocortin und Adiuretintyp des Ödems. ■ Natriumretention in Prozent der Einfuhr; ▨ Flüssigkeitsretention in Prozent der Einfuhr; ▩ Lithiumretention in Prozent der Einfuhr

Bei annähernd gleicher Flüssigkeitsretention ist die Lithiumausscheidung beim Adiuretinödem größer als beim Halocortinödem. Da auch die Natriumausscheidung größer ist, zeigt sich in diesen Versuchen erneut die Parallelität in der Elimination beider Kationen. Es ließ sich dabei auch demonstrieren, daß Lithium- und Flüssigkeitsausscheidung unabhängig voneinander ablaufen.

Diese Beobachtung haben wir noch durch Untersuchungen über das Verhalten des Lithium-Ions nach Gabe von Vasopressin erweitert. Hierbei interessierte vor allem der natriuretische Effekt dieses Hormones, der auf seiner antagonistischen Wirkung gegenüber den Halocortinen beruht. (R. Gaunt u. Mitarb., 1956; J. Beck, 1956; H. Herken, G. Senft u. J. Schaper, 1957). Die Experimente wurden an den Tieren der Gruppe A durchgeführt. Nach einer 24stündigen Dauerinfusion mit der natriumfreien hypotonen Lithiumchloridlösung wurde die Infusionsgeschwindigkeit von 2 auf 8 ml/Std erhöht. Bei dieser kontinuierlichen Vermehrung der Flüssigkeitseinfuhr wurden die heftigen Reaktionen der Tiere vermieden, die nach der in früheren Versuchen verabfolgten einmaligen Gabe von 5 ml der Infusionsflüssigkeit auftraten. Nach 1 Std wurde jedem Tier 100 mE Vasopressin i.v. injiziert, der Harn in der darauffolgenden Stunde gesammelt. Vasopressin reduzierte unter diesen Bedingungen die Flüssigkeitsausscheidung um 75% der Ausfuhr in der vorangehenden Stunde. Die Natriumkonzentration stieg von 10,2 auf 57,9 µval/ml an. Die Natriumausscheidung erhöhte sich von 79,9

auf 130,5 μval. Die Lithiumkonzentration wurde verfünffacht, so daß eine geringe Mehrausscheidung registriert werden konnte (Tab. 7).

Dieses Versuchsergebnis zeigt, daß eine Erniedrigung der Flüssigkeitausscheidung nicht zu einer Lithiumretention führt, wenn die

Tabelle 6. *Flüssigkeits-, Natrium- und Lithiumausscheidung bei adrenalektomierten Ratten der Gruppe A während einer 24stündigen oralen Dauerinfusion mit einer isotonischen NaCl-LiCl-Lösung*

(Natrium 138,6 μval/ml, Lithium 15,4 μval/ml)

	Flüssigkeit/ml	Natrium μval	Lithium μval
Einfuhr	48,0	6652,8	739, 2
Extrarenale Flüssigkeitsverluste	17,0	—	—
Einfuhr nach Abzug der extrarenalen Flüssigkeitsverluste	31,0	6652,8	739,2
Arithmethisches Mittel der Harnausscheidung	6,1	1456,1	238,8
Standardabweichung $\sigma \pm$	2,4	356,1	110,0
Retention in Prozent der Einfuhr	85,5	63,1	67,7

Tabelle 7. *Flüssigkeits-Natrium- und Lithiumausscheidung nach i.v.Injektion von 100 mE Vasopressin während der Infusion einer natriumfreien Lithiumchloridlösung*

(15,4 μval Li/ml, Infusionsgeschwindigkeit 8 ml/Std)

	Kontrollen	100 mE Vasopressin
Harnausscheidung ml/Std.	7,9	2,1
Standardabweichung $\sigma \pm$	1,5	0,93
p	0,0027	
Natrium/μval/ml	10,2	57,9
Standardabweichung $\sigma \pm$	7,3	36,3
p	0,0027	
Natrium μval	61,62	130,53
Standardabweichung $\sigma \pm$	30,1	74,2
p	0,01	
Lithium μval/ml	6,6	30,2
Standardabweichung $\sigma \pm$	1,5	7,7
p	0,0027	
Lithium μval	51,86	64,49
Standardabweichung $\sigma \pm$	14,0	17,4
n	7	7

Natriumausscheidung konstant bleibt bzw. sogar gesteigert wird. Das gleichsinnige Verhalten der Natrium- und Lithiumkonzentrationen im Harn weist darauf hin, daß auch der Stoffwechsel des Lithiumions durch Aldosteron gesteuert wird.

Die tierexperimentellen Studien zeigen, daß eine verminderte Ausscheidung von Lithium bei allen Ödemkrankheiten zu erwarten ist, die mit einer erniedrigten Natriumausscheidung einhergehen. Die Lithiumretention muß die gleiche hormonale Ursache haben, auf der auch die Natriumretention des Ödemkranken beruht. Bei dem jetzigen Stand unserer Kenntnisse über die Pathogenese des Ödems kann dieser Vorgang nur auf einer gesteigerten Tätigkeit des Aldosterons beruhen. Klinische Serienversuche könnten Aufklärung darüber bringen, ob die einmalige orale Verabreichung des Lithiumchlorids zur Darstellung und Differenzierung von Störungen im Mineralstoffwechsel und Wasserhaushalt geeignet ist, deren Erkennung sonst nur durch Aufstellung ausführlicher Natriumbilanzen oder durch Verwendung von radioaktiven Isotopen möglich ist.

Summary

Within four days 500 mg lithium chloride administered in one single dose are excreted almost quantitatively by normal subjects. Even under a sodium restricted diet 80 per cent of the lithium are found in the urine. Compared with these findings patients suffering from edema retained lithium. The cause of this retention has been investigated.

In experiments with constant oral infusion into rats it was observed that the lithium retention also depends upon the amount of sodium administered simultaneously.

Comparing investigations in rats with experimental edema of the halocortin type demonstrate the relation between sodium and lithium retention which are considered to be the consequence of hormonal effects. Animals with the halocortin type of edema retained the double amount of lithium compared with control rats if equal amounts of sodium are infused.

The results can be interpreted by a common regulation of the lithium and sodium excretion by aldosterone. The different physicalchemical properties of sodium and lithium are due to explain the difference between the amounts of their urinary excretion.

In adrenalectomized animals it was demonstrated that water and lithium excretion do not depend upon each other.

Vasopressin increased the urinary sodium and lithium concentration during infusion with hypotonic lithium chloride solution while the urine flow was depressed simultaneously.

Literatur

Beck, J. C.: Recent Progr. in Hormone Res. **12**, 194 (1956). — Foulks, J., G. H. Mudge and A. Gilman: Amer. J. Physiol. **168**, 642 (1952). — Gaunt, R., Ch. W. Lloyd and J. J. Chart: The Adrenal-Neurohypophysial Interrelationship (Mammalian Studies) prepared for the "Symposium on the Neurohypophysis" sponsored by The Colston Research Society and University of Bristol, Bristol, England April 9—12, 1956. — Herken, H.: Münch. med. Wschr. **1956**, 1181. — Herken, H., G. Senft u. H. Wilutzky: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 123 (1956). — Klin. Wschr. **1956**, 781. — Herken, H., G. Senft u. J. Schaper: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **230**, 284 (1957). — Luetscher, J. A. Jr.: Recent Progr. in Hormone Res. **12**, 175 (1956). — Overton, E.: Pflügers Arch. **92**, 346 (1902). — Radomski, J. L., H. N. Fuyat, A. A. Nelson and P. K. Smith: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **100**, 429 (1950). — Talso, P. J., and R. W. Clarke: Amer. J. Physiol. **166**, 202 (1951).

Prof. Dr. med. H. Herken, Pharmakologisches Institut der Freien Univ. Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 538—546 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg
(Vorstand: Professor Dr. Dr. W. Neumann)

Beiträge zur Pharmakologie von Phospholipase A

Von
Ernst Habermann

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. März 1957)

Unter dem Sammelbegriff Phospholipase A werden Enzyme zusammengefaßt, die aus bestimmten Phospholipoiden eine Fettsäure abspalten und so z. B. Lysolecithin (Lysocithin) aus Lecithin entstehen lassen (Übersicht bei Zeller). In den letzten Jahren wurde Phospholipase A als Ursache zahlreicher biochemischer Wirkungen tierischer Gifte erkannt [Übersicht bei W. Neumann (1)]. Wenig ist dagegen, wenn man von der indirekt hämolysierenden Wirkung des Enzyms absieht, über seine eigentliche Pharmakologie bekannt. Es gibt wohl kaum einen pharmakologischen Effekt tierischer Gifte, der nicht irgendeinmal auf Lecithinspaltung bezogen worden wäre. Die Beweisführung suchte man entweder auf einen gewissen Parallelismus zwischen der untersuchten Wirkung und dem Phospholipasegehalt des betreffenden Präparates zu gründen — wobei sich stets bei eingehender Untersuchung Ausnahmen ergaben — oder man strebte an, die in Frage stehende „Phospholipase"-Wirkung durch Lysocithin zu reproduzieren. Auch die letztgenannte Argumentierung ist aber nicht zwingend, da Lysocithin als stark oberflächenaktive Substanz die verschiedensten pharmakologischen Effekte ausüben kann, wenn es hoch genug dosiert wird, womit aber noch nicht gesagt ist, daß es im einzelnen Falle an Ort und Stelle durch das Enzym auch in ausreichender Menge entstünde.

In den letzten 20 Jahren ist Crotoxin (Slotta u. Fraenkel-Conrat) wiederholt als „kristalline Phospholipase" bezeichnet worden; es besteht aber in Wirklichkeit, wie W. P. Neumann u. Habermann inzwischen nachgewiesen haben, nur zum kleinen Teil aus dem Enzym, zur Hauptsache dagegen aus einem hochwirksamen Toxin Crotactin. Das von De beschriebene „kristallisierte Hämolysin" wurde bisher nur auf hämolytische, nicht aber auf Lecithinasewirkung hin untersucht. Versuche mit solchen Präparaten besagen nicht viel über eigentliche Phospholipaseeffekte.

Nachdem wir aus Bienengift ein sehr aktives, weitgehend gereinigtes, von den übrigen bekannten Wirkstoffen des Giftes praktisch freies Präparat von Phospholipase A dargestellt haben (Habermann, W. P. Neumann u. W. Neumann[1]), ist eine Entscheidung möglich, welche

[1] *Anmerkung bei der Korrektur:* inzwischen ausführlich (Habermann u. W. P. Neumann) veröffentlicht.

Wirkungen des Giftes *nicht* durch das Enzym hervorgerufen werden. Ob die restlichen pharmakologischen Effekte unseres Präparates nach Art und Stärke sämtlich nur auf das Enzym selbst zurückzuführen sind, kann zur Zeit noch nicht entschieden werden.

Experimenteller Teil

1. Allgemeintoxicität

Zur Methodik vgl. bei W. Neumann u. Habermann. Die LD 50 für die Enzymfraktion II liegt bei der weißen Maus bei intravenöser Injektion zwischen 10 und 20 mg/kg, die für Phospholipase etwa bei 7,5 mg/kg; einer genaueren Bestimmung der Allgemeintoxicität steht bisher ein relativer Substanzmangel im Wege. Die Überlebenszeit sinkt mit steigender Dosis.

Von je 3 Mäusen überlebten im Falle des Enzyms 3 bei 5 mg/kg, 2 bei 7,5 mg kg — die 3. starb nach 8 16 Std —; bei 10 mg kg starben die Tiere nach 2, 4 und 7 Std, bei 20 mg nach 90 min. Von der Enzymfraktion II wirkten 10 mg/kg noch nicht tödlich, 20 mg/kg töteten die Tiere in 2—3 Std, 40 mg/kg in 30—65 min.

Die Tiere verhalten sich nach der Einspritzung zunächst abnorm ruhig und atmen flach und beschleunigt, später legen sie sich auf die Seite. Terminal treten oft (hypoxämische?) Krämpfe auf, das Herz schlägt auch nach der Atemlähmung noch einige Zeit weiter. Bei fast allen, auch den überlebenden Tieren, ist der Harn intensiv rot, enthält aber bei den bisher untersuchten Tieren keine Erythrocyten. Bei der Sektion der gestorbenen Tiere fanden wir stets die Lungen stark vergrößert und gerötet. Beim Anschneiden floß rötliche Flüssigkeit heraus. Trachea und Pharynx war mit rötlichem Schaum gefüllt. Die Milz war meist stark vergrößert.

Die Befunde lassen sich am einfachsten durch die Annahme einer Überführung körpereigener Phospholipoide in Lysoverbindungen erklären, welche dann Hämolyse und wohl auch Permeabilitätserhöhung in Lunge und Harntrakt hervorrufen. Trotz der deutlichen Toxicität von Phospholipase A ist aber die Allgemeintoxicität von Bienengift und von Schlangengiften nur zum kleinsten Teil durch Phospholipase A bedingt, da unser Enzympräparat rund 25mal aktiver, aber deutlich weniger toxisch als gereinigtes Bienengift und als die enzymfreie Fraktion I ist. Bei den bisher von uns untersuchten Schlangengiften ist ebenfalls die Gesamttoxicität nur zum Teil durch den Phospholipasegehalt erklärbar.

Die i.v. LD 50 von Lysocithin (aus Eigelb) liegt bei 150 mg/kg. Es müßten also — gleiche Toxicität von im Eigelb und im Organismus durch das Enzym entstehendem Lysocithin vorausgesetzt — bei Vergiftung durch die LD 50 von Phospholipase A im Körper einer 20 g schweren Maus 3 mg oder — bei einem Molekulargewicht von 524 — $5{,}7 \cdot 10^{-6}$ Mol Lysocithin entstehen. Eine solche Lysocithinmenge wird in vitro im Warburg-Ansatz [Habermann (3)] bereits durch ungefähr $^1/_{600}$ der injizierten Fermentmenge, nämlich 0,25 γ binnen 30 min gebildet. Die Vergiftungssymptome sind beim Lysocithin die gleichen wie bei Phospholipase; bereits nach wenigen Minuten findet sich ein blutig gefärbtes

Lungenödem, und ebenso tritt, wenn die Dosis für Stunden überlebt wird, in einem Teil der Fälle roter, aber erythrocytenarmer Harn auf. Bei der Toxicitätsbestimmung von Klapperschlangengift und von Crotactin dagegen sahen wir diese beiden Symptome niemals, was gegen eine entscheidende Rolle von Phospholipase bei der Vergiftung durch diese beiden Substanzen spricht.

2. *Lokale Wirkungen*

Die lokale Reizwirkung von Fraktion II und Phospholipase ist im Vergleich zu der von Bienen-Gesamtgift sehr schwach. Während von unserem als Ausgangsmaterial verwandten Gift noch 0,0125 mg in 0,05 cm³ physiologischer Kochsalzlösung am Kaninchenauge deutlich Hyperämie, Schwellung, Hypersekretion sowie geringen Lidspasmus erzeugten, reagierten die Konjunktiven auf etwa 0,5 mg von Fraktion II oder Phospholipase nur mit einer angedeuteten Hyperämie und Hypersekretion. Die Capillardurchlässigkeit wurde bei Kaninchen durch das Ausgangsgift erwartungsgemäß stark erhöht, Fraktion II war mindestens 10mal schwächer und Phospholipase noch weniger aktiv.

Als z. B. ein weibliches Kaninchen von 3,5 kg i.v. 5 mg/kg *Evansblue* und dann Giftquaddeln mit je 0,1 cm³ Tyrodelösung in die zuvor enthaarte Rückenhaut erhielt, war deren Blaufärbung bei 1 γ Bienen-Nativgift sehr stark, bei 1 γ F II oder Phospholipase nur angedeutet, bei 10 γ F II stark, bei 10 γ Phospholipase deutlich. 0,1 γ Nativgift war wirkungslos. Während die Nativgift oder Fraktion II enthaltenden Quaddeln sich infolge ihres Hyaluronidasegehalts schnell abflachten, blieben die nur Phospholipase enthaltenden annähernd so lange bestehen wie die Kontrollquaddeln.

Vor einiger Zeit haben wir zusammen mit Lamparter nachgewiesen, daß das die Capillar- und Zellpermeabilität erhöhende Prinzip des Bienengiftes in Fraktion I zu suchen ist und nur wenig schwächer wirkt als Gesamtgift. Die jetzt durchgeführten Experimente bestätigen diese älteren Ergebnisse und auch den schon von Lamparter gezogenen Schluß, daß Hyaluronidase der einzige spreading factor von Bienengift ist.

3. *Direkte Hämolyse*

Versuche an menschlichen Erythrocyten. Bei Darstellung der Bienengiftfraktion II erfolgt eine starke Anreicherung der Enzyme, während gleichzeitig die direkt-hämolytische Aktivität auf weniger als 1% im Vergleich zum Ausgangsmaterial zurückgeht. Auch unser Präparat von Phospholipase A selbst enthält weniger als 1% dieser Aktivität des Ausgangsmaterials. Wie schon früher mehrfach betont, gehen Phospholipasegehalt und direkte Hämolyse nicht parallel, doch ist durch papierelektrophoretisch gewonnene Fraktion II eine starke Aktivierung der Fraktion I-Hämolyse zu erzielen (W. Neumann u. Habermann). Wie zu erwarten wird auch durch unser Phospholipasepräparat die Fraktion I-Hämolyse verstärkt.

Vereinigte man z. B. eine 1,2%ige Erythrocytensuspension in physiologischer Kochsalzlösung mit dem gleichen Volumen einer Fraktion I-Verdünnungsreihe in Phosphatpuffer p_H 7,0, so verminderte noch eine Phospholipasekonzentration von $1:4 \cdot 10^7$ im Ansatz die bei 37° 50% Hämolyse erzeugende F I-Dosis um ein Drittel.

Versuche an Meerschweinchen-Erythrocyten. De hat ein kristallisiertes, relativ wenig toxisches Protein aus Colubridengift dargestellt und als „Lecithinase" bezeichnet. Den Nachweis einer Lecithinspaltung hat er jedoch nicht erbracht; es wurde lediglich die (auch ohne Phospholipoid-Zusatz eintretende) Hämolyse von Meerschweinchen-Erythrocyten durch Lecithingabe verstärkt. Um einen annähernden Vergleich mit der Aktivität des Präparates von De zu erhalten, stellten wir in seiner Anordnung mit und ohne Lecithinzusatz die hämolytische Wirkung von Tripudiansgift der von Fraktion I, Fraktion II und Phospholipase A aus Bienengift gegenüber.

Meerschweinchenblut, durch Herzpunktion gewonnen und durch Vermischen mit Citratlösung ungerinnbar gemacht, wurde 3mal mit einer auf p_H 7,5 eingestellten Kochsalz(0,81%)-Natriumacetat(0,198%)-Lösung gewaschen. Jeweils 0,3 cm³ Gift-Kochsalzlösung wurden mit 0,2 cm³ Lecithinsuspension 1:4000 in der erwähnten gepufferten Kochsalzlösung (bei a) bzw. mit 0,2 cm³ gepufferter Kochsalzlösung (bei b) und mit 1,0 cm³ 5%iger Erythrocytensuspension in gepufferter Kochsalzlösung bei 37° vereinigt und auf Eintritt kompletter Hämolyse beobachtet.

Tabelle 1. *Hämolyse durch Kobragift und Bienengift-Bestandteile* (Dauer bis zur kompletten Hämolyse in Minuten; vgl. Text)

Konzentration γ/cm³	Naja tripudians-Gift				Bienengiftfraktion I				Konzentration γ/cm³	Bienengiftfraktion II				Phospholipase	
	Meerschw.-Erythroc.		Menschen-Erythroc.		Meerschw.-Erythroc.		Menschen-Erythroc.			Meerschw.-Erythroc.		Menschen-Erythroc.		Meerschw.-Erythroc.	
	a	*b*	*a*	*b*	*a*	*b*	*c*	*b*		*a*	*b*	*a*	*b*	*a*	*b*
200	10	10	70	180	0,13	0,08	—	—	40	—	—	120	> 360	—	—
100	13	17	140	180	—	—	0,07	0,07	20	22	40	300	—	13	43
50	27	30	180	220	0,17	0,12	0,13	0,12	10	30	55	> 360	—	20	49
25	44	110	315	330	—	—	0,47	0,40	5	49	86	—	—	26	62
12,5	109	> 180	> 360	> 360	0,83	0,75	17	2,4	2,5	61	92	—	—	41	70
6,25	> 180	> 180	—	—	—	—	—	—	1,25	70	150	—	—	49	110
3,13	> 180	> 180	—	—	25	25	—	—	0,625	150	210	—	—	70	150
									0,313	> 180	> 180	—	—	150	> 180

Im Gegensatz zu menschlichen Erythrocyten sind die von Meerschweinchen gegen Phospholipase A empfindlich. Ihre Angreifbarkeit durch dieses Enzym wird durch Lecithinzusatz deutlich verstärkt. Sie werden jedoch außerdem durch das „direkte", d. h. durch Lecithin nicht aktivierte, sondern im Gegenteil etwas gehemmte [Habermann (2)] Hämolysin von Bienengift (= Fraktion I) geschädigt. Infolgedessen ist das Verfahren von De nur dann zur Aktivitätsbestimmung von Phospholipase A brauchbar, wenn die Anwesenheit weiterer, direkter Hämolysine ausgeschlsosen ist; denn an Meerschweinchen-Erythrocyten ist, anders als bei denen des Menschen, eine Differenzierung zwischen Phospholipase A und direkten Hämolysinen nicht möglich. Ferner ist ein Vergleich zwischen dem neben Lecithinase wahrscheinlich ein direktes Hämolysin enthaltenden Tripudiansgift und unserer Phospholipase zunächst unmöglich, weil sich beide Faktoren eventuell, wie beim Bienengift, gegenseitig beeinflussen. Wir halten auf Grund der Mehrdeutigkeit der Testmethode den Lecithinasecharakter des kristallisierten Hämolysins von De für unbewiesen. Van Heyningen ist — allerdings ohne eigene Experimente — zu dem gleichen Schluß gekommen.

Möglicherweise sind die Erythrocyten des Meerschweinchens deshalb gegen Phospholipase A empfindlicher als die des Menschen, weil sie unter den angewandten Bedingungen eine stärkere Tendenz zu spontaner Hämolyse aufweisen. Das durch Zerfall einiger Erythrocyten freiwerdende Lecithin könnte durch das Enzym in Lysocithin und Fettsäure übergeführt werden, die ihrerseits durch Hämolyse weiteres Lecithin in angreifbaren Zustand bringen und dadurch die Reaktion lawinenartig anschwellen lassen könnten.

4. Blutdruckwirkung

Injiziert man mit Pernocton narkotisierten Katzen Fraktion II bzw. Phospholipase A, so kommt es bei Dosen von 0,1—0,7 mg/kg bei erstmaliger Injektion zu starker, mindestens mehrere Minuten währender Blutdrucksenkung, welche deutlich langsamer einsetzt als die durch Histamin, Acetylcholin oder Lysocithin bedingte. Der Druck kann anschließend das alte Niveau wieder erreichen; es ist dies aber nicht immer der Fall. Stets wird relativ schnell, spätestens binnen 1 Std die Atmung flach und unregelmäßig, so daß künstlich beatmet werden muß. In jedem Fall aber bleibt, selbst wenn der Druck nach der ersten Fermentgabe zur Norm zurückgekehrt und die Atmung nur wenig verlangsamt ist, eine zweite, gleich große Dosis von Enzym oder Fraktion II ohne Effekt. Es liegt also sehr starke Tachyphylaxie vor (Abb. 1). Wir vermuten, daß durch die fermentative Spaltung körpereigener Lipoide Lysoverbindungen entstehen und ihrerseits den Blutdruck senken. In der Tat läßt sich durch Lysocithin [Neumann (2); Schwab] und auch durch mit Fraktion II bebrütetes Eigelb der Blutdruck in gleicher Weise senken. Das Ausbleiben einer Blutdrucksenkung bei wiederholter Einspritzung des

Enzyms spricht dafür, daß dieses in der obengenannten Dosierung schon beim erstenmal die ihm erreichbaren Phospholipoide praktisch vollständig umsetzt. Daß die Drucksenkung durch vorbebrütetes Eigelb nicht auf der beigefügten Fraktion II, sondern auf Reaktionsprodukten beruht, geht daraus hervor, daß sie wie die Drucksenkung durch Lysocithin am gleichen Tier mehrmals reproduzierbar ist.

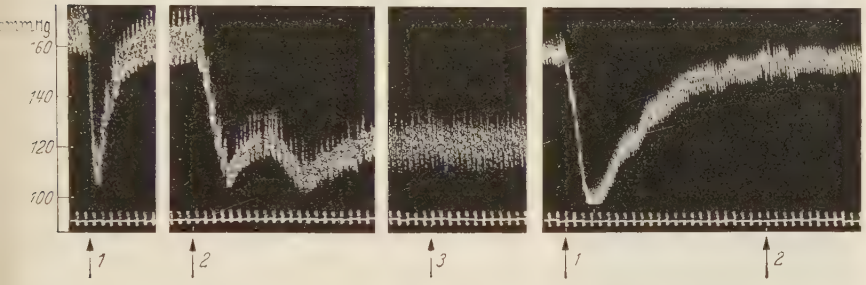


Abb. 1. Blutdrucksenkung und Störung der Atemtätigkeit durch Phospholipase A. 1a: Katze, 2,6 kg. Pernoctonnarkose. *1* 0,25 γ Acetylcholin; *2* u. *3* je 250 γ Phospholipase A; dazwischen etwa 10 min Pause, in der Atemlähmung eintrat und künstliche Beatmung mit der Starling-Pumpe eingeleitet wurde. 1b: Katze, 2,3 kg. Pernoctonnarkose. *1* u. *2* je 250 γ Phospholipase A. Etwa 20 min nach 2 Atemlähmung. Zeitschreibung: 12 sec

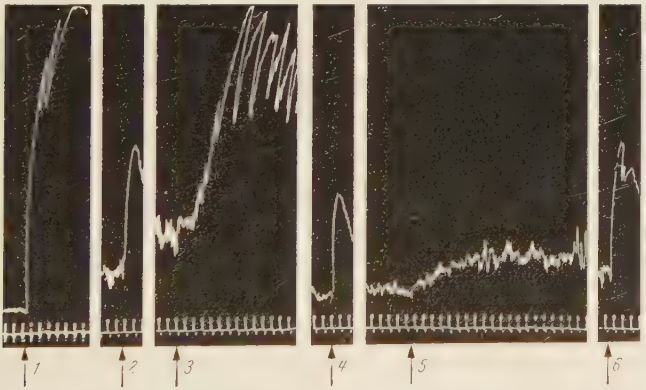


Abb. 2. Erregung des isolierten Meerschweinchenileums. *1* 1 γ Histamin; *2*, *4*, *6* je 0,1 γ Histamin; *3* u. *5* je 500 γ Fraktion II. Zeitschreibung: 12 sec

5. Wirkung am isolierten Meerschweinchenileum

Auf Lösungen 1:40000 von Fraktion II oder Phospholipase reagiert das isolierte, in Warmblütertyrode bei 37 suspendierte Meerschweinchenileum mit einer starken Kontraktion, welche sich auch ohne Spülung spontan wieder löst. Anschließend ist auch nach mehrfachem Wechsel der Badflüssigkeit die initiale Dosis gänzlich oder fast vollständig unwirksam, während die Histaminkontraktion auslösbar bleibt (Abb. 2). Wie am

Blutdruck besteht also eine sehr starke Tachyphylaxie. Lysocithin ruft im Gegensatz zu Phospholipase A in jedem Fall Erschlaffung hervor [Neumann (2)]; gelegentlich geht dieser eine kurze Kontraktion voraus (Albl).

Tachyphylaxie scheint eine allgemeine Folge der Reaktion tierischer Gifte mit glattmuskulären Organen zu sein, wird aber wohl nicht nur durch Phospholipase A hervorgerufen. Wir beobachteten sie bei dem Haupttoxin des Bienengiftes (Fraktion I), und ebenso bei der Prüfung von Crotactin, dem phospholipasefreien Haupttoxin von Crotalus terrificus (W. P. Neumann u. Habermann). Die Tachyphylaxie gegen Fraktion I ist jedoch viel geringer als gegen Fraktion II bzw. Phospholipase und meist mit einer Abschwächung der Histaminkontraktion verbunden. So ist es verständlich, daß die Tachyphylaxie gegen Bienen-Gesamtgift ausgeprägter ist als die gegen Fraktion I, was auch aus Versuchen von Albl hervorgeht (Abb. 3).

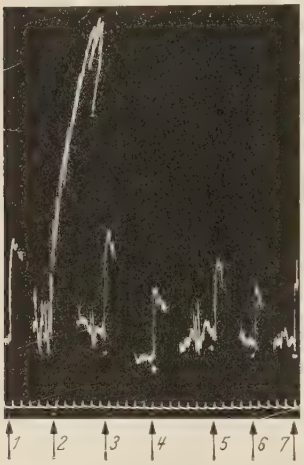


Abb. 3. Tachyphylaxie gegen gereinigtes Bienengift sowie Fraktion I am isolierten Meerschweinchenileum. *1, 3, 5, 7:* 1 γ Fraktion I; *2, 4, 6:* 1 γ gereinigtes Bienengift. Zeitschreibung: 12 sec

6. Wirkung auf Herz- und Skeletmuskulatur

Am isolierten Froschherzen hat unser Phospholipasepräparat nur schwache, am isolierten Froschrectus keine Effekte.

Das Froschherz reagiert auf Lysocithin 1:1000 mit allmählicher Kontraktur. Demgegenüber vergrößert Fraktion II 1:2500 lediglich die Hubhöhe, Phospholipase A 1:5000 erzeugt eine geringe Vermehrung der Systole mit schwacher Kontraktur. Am Froschrectus ist Fraktion II 1:5000 ohne jeden Effekt, auch die Acetylcholinkontraktion wird nicht abgeschwächt.

Besprechung der Ergebnisse

Phospholipase A ist an verschiedenen Organen und Organsystemen deutlich aktiv. Dies spielt jedoch — zum mindesten im Fall des Bienengiftes — keine erhebliche Rolle gegenüber den Effekten gleichzeitig vorhandener *Toxine im engeren Sinn* des Wortes. Die Allgemeintoxicität unserer gereinigten Phospholipase liegt mit einer LD 50 von etwa 7,5 mg/kg zwar in der gleichen Größenordnung wie die der Fraktion I (3,5 mg/kg); da jedoch die eiweißartigen Komponenten des Bienengiftes weit überwiegend aus Fraktion I bestehen, tritt beim Gesamtgift der Anteil der Phospholipase stark zurück. Es bestehen also die gleichen Verhältnisse wie beim Klapperschlangengift, wo die Allgemeintoxicität durch 2 Toxine im engeren Sinn, nämlich Crotactin und Crotamin,

bedingt wird, während die relativ schwache Phospholipase höchstens eine untergeordnete Rolle spielt. Auch beim Gift von Naja nigricollis liegt nach HABERMANN (1) das Maximum der Allgemeintoxicität in einer anderen Fraktion (C) als das der Phospholipase (E), obwohl das damals aus dem Schlangengift dargestellte Phospholipasepräparat deutlich toxischer war als das weiter gereinigte, aus Bienengift gewonnene.

Das Problem der „direkten" und „indirekten" Hämolyse erwies sich im Laufe dieser Arbeit als erheblich verwickelter als ursprünglich vermutet werden konnte. Am gewaschenen Menschenerythrocyten bewirkt im lecithinfreien Ansatz nur Fraktion I, nicht aber Phospholipase A in den untersuchten Konzentrationen eine direkte Hämolyse. Dies entspricht unseren früheren Ergebnissen. Neu ist, daß Meerschweinchenerythroycten durch jeden der beiden Stoffe hämolysiert werden. Ob ein Stoff „direkt" wirkt, oder nur „indirekt", d. h. erst durch Umbau einer zugefügten Substanz in ein hämolytisches Agens, hängt also auch von der Erythrocytenart ab.

Die durch Phospholipase erzeugte Blutdrucksenkung ist zu schwach, um gegenüber der durch die Bienengiftfraktion I und Histamin bewirkten ernstlich ins Gewicht zu fallen, zumal sie nur nach der ersten Injektion voll auftritt. Lediglich bei hohen Dosen von Bienengift könnte die initiale Blutdrucksenkung durch deren Phospholipasegehalt mit bedingt sein; Fraktion I vermag aber in gleicher Dosierung den nämlichen vagalen Symptomenkomplex auszulösen [HABERMANN (2)]. Am isolierten Meerschweinchendarm läßt sich die Addition der Eigenwirkung von Fraktion I und Phospholipase A zum Effekt des Gesamtgiftes erkennen. Aber auch hier ist Fraktion II bzw. Phospholipase A infolge der sehr ausgesprochenen Tachyphylaxie nur bei den ersten Dosen von Bedeutung.

Vergleicht man die starken pharmakologischen Effekte tierischer Gifte mit den relativ schwachen, die durch hohe Dosen von Phospholipase A zu erzielen sind, so liegt der Schluß nahe, daß dieses Enzym keine grundsätzliche Rolle bei der Wirkung der Gesamtgifte spielt. Zwar ist es theoretisch interessant, daß durch Abbau von Phospholipoiden, vielleicht durch das hierbei entstehende Lysocithin, gewisse pharmakologische Allgemeinwirkungen hervorgebracht werden können. Die eigentliche Rolle von Phospholipase A dürfte jedoch mehr mit ihren mannigfaltigen lokalen Angriffspunkten an Struktur und Stoffwechsel von solchen Zellen zusammenhängen, welche bereits durch andere Giftkomponenten für das Enzym zugänglich gemacht wurden.

Zusammenfassung

Einige pharmakologische Eigenschaften der Enzymfraktion von Bienengift und eines daraus dargestellten Präparates von Phospholipase A werden beschrieben.

Für sich allein sind beide Substanzen am Froschrectus und am isolierten Froschherzen unwirksam. Sie besitzen aber Allgemeintoxicität, senken den Blutdruck und erregen den isolierten Meerschweinchendarm bei erstmaliger Gabe. In beiden Fällen tritt starke Tachyphylaxie ein.

Phospholipase A und in geringerem Maße die Enzymfraktion von Bienengift hämolysieren gewaschene Meerschweinchenerythrocyten, nicht aber Menschenerythrocyten, in Abwesenheit von Lecithin.

Die pharmakologischen Wirkungen tierischer Gifte können nur zum kleinen Teil auf Phospholipase A bezogen werden.

Literatur

Albl, F.: Inaug. Diss. Würzburg 1956. — De, S. S.: Indian J. Med. Res. **27**, 793, 807 (1940). — Sci. a. Cult. **6**, 675 (1941). — Habermann, E.: (1) Z. physiol. Chem. **297**, 104 (1954). — (2) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 173 (1954). — (3) Biochem. Z. **328**, 474 (1957). — Habermann, E., u. W. P. Neumann: Biochem. Z. **328** 465 (1957). — Habermann, E., W. P. Neumann u. W. Neumann: Naturwissenschaften **43**, 84 (1956). — Lamparter, W.: Inaug. Diss. Würzburg 1954. — Neumann, W.: (1) Naturwissenschaften **41**, 322 (1954). — (2) Ber. Physikal. Med. Ges. Würzburg, N.F. **66**, 166 (1953). — Neumann, W., u. E. Habermann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 367 (1954). — Neumann, W. P., u. E. Habermann: Biochem. Z. **327**, 170 (1955). — Schwab, M.: Inaug. Diss. Würzburg 1950. — Slotta, K. H., u. H. L. Fraenkel-Conrat: Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 1076 (1938). — Van Heyningen, W. E.: In Neurath-Bayley, „The Proteins", II A, S. 345. New York, 1954. — Zeller, E. A.: In Sumner-Myrbäck, The Enzymes I, 2, S. 986. New York, 1951.

Priv.-Doz. Dr. E. Habermann, Pharmakologisches Institut der Univ. Würzburg, Koellikerstr. 2

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 547—551 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Universität, Pécs (Ungarn)
(Direktor: Prof. Dr. J. Méhes)

Über die kombinierte Wirkung von Luminal-Na und Analeptica auf die Phosphatesterbildung bzw. Atmungskettenphosphorylierung von Rattengehirnhomogenaten

Von
L. Decsi

(Eingegangen am 27. März 1957)

In der Erklärung des biochemischen Mechanismus der Barbituratwirkung bedeutete einen großen Fortschritt die Erkenntnis, daß die Atmungskettenphosphorylierung durch Barbiturate in vitro entkoppelt wird (Bain). Diese Beobachtung wurde von mehreren Seiten bestätigt (Brody u. Bain; Brody, 1955a), und führte zu dem Schluß, daß die Barbiturate ihre pharmakologische Wirkung durch Hemmung der oxydativen Phosphorylierung in den Nervenzellen entfalten (Brody, 1955b). Doch beruht diese Annahme nur auf in vitro Untersuchungen und ihre Bestätigung in vivo fehlt noch. Daneben gibt es eine Reihe von experimentellen Tatsachen, die mit dieser Erklärung der Barbituratwirkung nicht leicht in Einklang gebracht werden können:

1. Die krampferzeugenden Barbiturate hemmen die oxydative Phosphorylierung (Brody u. Bain) und die O_2-Aufnahme (Herbain u. Jegnier) im gleichen Maße, ja sogar stärker, als die schlaferzeugenden Derivate.

2. Luminalbehandlung ruft im energiereichen Phosphatgehalt des Gehirns in vivo keine Abnahme hervor, wie man es nach einer Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung erwarten sollte, sondern eine Zunahme (Palladin; Weil-Malherbe; Decsi).

3. Der Einbau von P^{32} in die Gehirnnucleinsäuren in vivo geht bei luminalbehandelten Kaninchen schneller vor als bei intakten (Palladin).

4. Es gibt Arzneimittel, die sicher zentral wirken und in vitro dieselbe entkoppelnde Wirkung wie die Barbiturate ausüben [z. B. Salicylate (Brody, 1955a) und sogar das Cardiazol (Decsi)], jedoch keine hypnotische Wirkung besitzen.

Es gibt also eine Reihe von Tatsachen, die gegen die obenerwähnte Hypothese der Luminalwirkung sprechen. So schien es uns angebracht, dieser Frage von einer anderen Seite her näherzukommen.

Die in vivo-Wirkung von Luminal kann durch die verschiedensten Analeptica aufgehoben werden. Im Sinne der obenerwähnten Hypothese sollte dies bedeuten, daß die Analeptica der entkoppelnden Barbituratwirkung entgegenarbeiten. Könnte die Aufhebung in vitro nachgewiesen werden, so hätte man einen entscheidenden Beweis für die Richtigkeit der obenerwähnten Hypothese gewonnen. Wenn es aber nicht gelingt, einen Antagonismus in vitro nachzuweisen, so bedeutet dies noch nicht, daß die Hypothese nicht richtig ist, wenngleich das Fehlen eines solchen Antagonismus viel mehr gegen als für die Hypothese spricht.

Auf Grund dieser Überlegungen haben wir geprüft, ob einige prompt wirkende Analeptica die entkoppelnde Luminalwirkung in vitro beeinflussen oder nicht. Es wurde die Wirkung von Coffein, Cardiazol (Pentamethylentetrazol) und Aktedron (Phenyl-isopropylamin) untersucht.

Methodik

Die Versuche wurden an Rattenhirnhomogenaten und an Rohpräparaten von Mitochondrien vom Rattengehirn durchgeführt. Das gleich nach der Enthauptung herausgenommene Gehirn wurde mit dem folgenden Medium homogenisiert („*Medium II*"): 0,062 *M* KCl, 0,031 *M* $MgSO_4$, 0,008 *M* Nicotinsäureamid und 0,046 *M* NaF. Die eigentliche Messung der Phosphatestersynthese geschah im folgenden Medium („*Medium I*"): 0,063 *M* KCl, 0,0072 *M* $MgSO_4$, 0,01 *M* Phosphatpuffer (p_H 7,4) 0,012 *M* $NaHCO_3$, 0,0052 *M* Nicotinsäureamid, 0,031 *M* NaF und 0,005 *M* ADP-Na.

Es wurde 2,5 ml des *Medium I* in einen kleinen Erlenmeyer-Kolben einpipettiert und eine bestimmte, im allgemeinen etwa 180—200 mg Gehirn entsprechende Menge des Homogenats zugegeben. Als Substrat diente in allen Fällen Glucose (0,02 Mol Endkonzentration). Von jedem Gehirn wurden 6—8 Präparate gefertigt, von denen 2 sofort mit 5 ml 5%iger Trichloressigsäure enteiweißt wurden, die übrigen erst nach 20 min langer Inkubation bei 38° C unter dauerndem Schütteln. Die Pharmaka wurden in 1,15%igem KCl gelöst.

Der anorganische Phosphatgehalt wurde mit der Methode von Lowry-Lopez bestimmt. Als Maß der Phosphatesterifikation betrachteten wir die verschwundene Menge des anorganischen Phosphats, in Milligramm P/g Feuchtgewicht/Stunde berechnet. Die P/O-Ration liegt unter diesen Versuchsbedingungen zwischen 1,25—1,45.

Die Messung der oxydativen Phosphorylierung geschah in einem Teil der Versuche an Homogenaten unter Zugabe von 0,02 *M* Na-pyruvicum, 0,002 *M* Namalicum (Endkonzentrationen) und 0,1 ml einer Hexokinaselösung (Aktivität: 50 mikromol Glucose pro 15 min pro 0,1 ml). Nach einer Vorperiode von 7,5 min wurde die O_2-Aufnahme über weitere 7,5 min mit der üblichen Warburg-Methode gemessen, und die während der ganzen Periode verzehrte Sauerstoffmenge durch Extrapolation berechnet. Die P/O-Rationen liegen in diesen Versuchen zwischen 1,4—1,7.

In anderen Versuchen haben wir die Homogenate 5 min lang mit etwa 800 g in der Kälte zentrifugiert, und das Supernatans („Rohpräparat von Mitochondrien") als Enzymquelle gebraucht. Die P/O-Ration liegt unter diesen Versuchsbedingungen zwischen 2,3—2,8.

Alle Versuche wurden in eisgekühlten Gefäßen und mit eiskalten Lösungen durchgeführt.

Hexokinase wurde nach Berger u. Mitarb., ATP und ADP nach LePage hergestellt. Die verwendeten Chemikalien waren käufliche „pro Analysi"-Präparate.

Versuchsergebnisse

Die Versuche über Wirkung des Luminal-Natriums auf die Atmungskettenphosphorylierung mit und ohne 80 μg/ml Aktedron sind in Tab. 1 ausführlich dargestellt. Tab. 2 ist eine Zusammenfassung aller mit dem Aktedron ausgeführten Versuche. Wie ersichtlich, erzeugen 700 μg/ml Luminal-Na eine Hemmung um 40%. Diese hemmende Wirkung wird durch 10—80 μg/ml Aktedron nicht beeinflußt.

Tabelle 1. *Wirkung von 800 μg/ml Luminal-Na mit und ohne 80 μg/ml Aktedron auf die oxydative Phosphorylierung (Rattenhirnhomogenate)*

ΔO μ Atom/g/h			ΔP μ Mol/g/h			P/O		
Kontr.	Lumin.	Lumin. + Akt.	Kontr.	Lumin.	Lumin. + Akt.	Kontr.	Lumin.	Lumin. + Akt.
186,5	164,9	151,0	486	272	256	2,61	1,65	1,70
186,0	156,2	148,0	479	207	256	2,57	1,32	1,73
185,0	145,3	145,4	471	198	212	2,55	1,36	1,46
180,0	142,8	142,1	446	185	175	2,48	1,30	1,23
164,8	138,8	131,8	437	142	168	2,65	1,03	1,27
163,2	138,6	125,0	386	166	144	2,36	1,20	1,15
142,2	92,0	121,0	376	158	133	2,64	1,72	1,10
128,2	86,6	114,4	368	122	116	2,95	1,41	1,02
Mittelwerte								
167 ±17	131,9 ±9,8	134,6 ±4,5	431 ±12	181 ±28	182 ±28	2,59 ±0,16	1,37 ±0,29	1,35 ±0,3
Diff. zur Kontrolle in Prozent	—21,0	—19,4		—57,9	—57,6		—47,1	—47,8

Tabelle 2. *Wirkung des Luminals mit und ohne Aktedron auf die Atmungskettenphosphorylierung*

Zahl der Versuche[1]	Behandlung	P/O	Differenz zur Kontrolle in Prozent
41	—	2,02 ± 0,23	—
37	700 μg/ml Luminal	1,21 ± 0,17	—40,1
40	700 μg/ml Luminal + 10—80 μg/ml Aktedron	1,25 ± 0,13	—38,2

[1] Davon 17 an Homogenaten, die anderen an Rohpräparaten von Rattengehirnmitochondrien.

Im O_2-Verbrauch ruft diese Luminal-Na-Konzentration eine 20%ige Verminderung hervor. Auch diese bleibt durch das Aktedron unbeeinflußt (Tab. 3).

Aktedron allein beeinflußt — in den untersuchten Konzentrationen — weder die O_2-Aufnahme noch die oxydative Phosphorylierung.

In einem System ohne Hexokinase, in welchem wir nur die Phosphataufnahme, nicht aber den O_2-Verbrauch gemessen hatten, hemmte Luminal-Na die Phosphatestersynthese in gleichem Maße wie in den obenerwähnten Versuchen.

Da aber zur Entscheidung der uns vorgelegten Fragen nur die Messung der Phosphataufnahme von Bedeutung ist — ferner aus technischen Gründen —, haben wir in den weiteren Versuchen nur die Phosphataufnahme bestimmt und keine direkte Messung der P/O-Ration durchgeführt.

Tabelle 3. *Wirkung des Luminals mit und ohne Aktedron auf die O_2-Aufnahme der Rattenhirnhomogenate*

Zahl der Versuche	Behandlung	Q_{O_2}	Differenz zur Kontrolle in Prozent
44	—	$10{,}0 \pm 0{,}34$	—
41	700 μg/ml Luminal	$7{,}88 \pm 0{,}20$	—21,2
42	700 μg/ml Luminal + 10—80 μg/ml Aktedron	$7{,}59 \pm 0{,}19$	—24,1

Tabelle 4. *Wirkung des Luminals mit und ohne Analeptica auf die Phosphatestersynthese von Rattengehirnhomogenaten*

Zahl der Versuche	Behandlung	ΔP mg/g/h	Differenz zur Kontrolle in Prozent
82	—	$4{,}7 \pm 0{,}15$	—
47	700 μg/ml Luminal	$2{,}72 \pm 0{,}13$	—42,1
14	700 μg/ml Luminal + 50—300 μg/ml Coffein	$2{,}40 \pm 0{,}16$	—48,9
24	700 μg/ml Luminal + 15—120 μg/ml Aktedron	$2{,}50 \pm 0{,}13$	—46,7
10	700 μg/ml Luminal + 43—200 μg/ml Cardiazol	$2{,}50 \pm 0{,}17$	—46,7

In Tab. 4 ist der Einfluß der untersuchten 3 Analeptica auf die Luminalhemmung der Phosphatestersynthese zusammengestellt. Keines der untersuchten Analeptica war, wie aus der Tabelle hervorgeht, geeignet, die durch Luminal-Na verursachte Hemmung der Phosphatestersynthese in irgendwelcher Richtung zu beeinflussen.

Wie schon oben beschrieben wurde, hat Aktedron für sich keinen Einfluß auf die Phosphataufnahme, Coffein und Cardiazol (in Konzentrationen von 300 bzw. 200 μg/ml) setzen sie etwas herab (15—25%).

Besprechung der Ergebnisse

In den obigen Experimenten versuchten wir die durch das Luminal gehemmte oxydative Phophorylierung der Gehirnzellen in vitro mit Analeptica zu beeinflussen. Die Versuche hatten ein negatives Ergebnis:

weder Coffein noch Aktedron oder Cardiazol änderten in vitro die Luminalwirkung.

Eine in vivo-Beeinflussung der obengenannten Luminalwirkung durch Analeptica kann natürlich nicht ausgeschlossen werden; vielleicht findet dieser Prozeß in einem umschriebenen Bezirk des Zentralnervensystems statt, der den beschränkten Möglichkeiten der in vitro-Untersuchungen nicht zugänglich ist.

Daß ein Unterschied im in vitro-Verhalten bestimmter Gehirnteile gegenüber Pharmaka bestehen kann, wurde schon früher nachgewiesen (für Thyroxin: Méhes u. Pintér, für Narkotica und Analeptica: Pintér, Méhes u. Decsi; Méhes, Decsi u. Kovács; und für Largactil: Decsi). Überdies können die Stoffwechselbedingungen der Zellen ganz anders in vitro als in vivo liegen. Auch der Angriffspunkt der Analeptica kann natürlich in ganz anderen Hirnteilen oder Stoffwechselprozessen liegen, als denjenigen, die das Luminal angreift. Unsere negativen Befunde können also nicht als direkter Beweis gegen die Entkoppelungstheorie der Luminalwirkung verwertet werden. Im Hinblick auf die in der Einleitung angeführten Widersprüche sowie auf unsere Versuchsresultate bedarf jedoch die Entkoppelungstheorie der Luminalwirkung mehr befriedigender Beweise.

Zusammenfassung

1. Es wurde die Wirkung von Aktedron, Coffein und Cardiazol auf die durch Luminal gehemmte oxydative Phosphorylierung der Gehirnzellen untersucht.

2. Keines der genannten Analeptica konnte die entkoppelnde Luminalwirkung in irgendwelcher Weise beeinflussen.

3. Unsere Versuchsergebnisse unterstützten nicht die Auffassung, daß im Wirkungsmechanismus des Luminals die Hemmung der oxydativen Phosphorylierung allein eine entscheidende Rolle spielt.

Literatur

Bain, J. A.: Federat. Proc. **11**, 653 (1952). — Berger, L., M. W. Slein, S. P. Colovick u. C. F. Cori: J. Gen. Physiol. **9**, 379 (1946). — Brody, T. M.: a) J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **8**, 113 (1955). — b) Pharmacol. Rev. **7**, 335 (1955). — Brody, T. M., and J. A. Bain: J. of Pharmacol. a. Exper. Ther. **110**, 148 (1954). — Decsi, L.: Unveröff. Versuche. — Herbain M., et R. Jequier: Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **37**, 873 (1955). — LePage, G. A.: Biochemical Preparations, Vol. I. New York: John Wiley and Sons 1950. — Lowry, O. H., and J. A. Lopez: J. of Biol. Chem. **162**, 241 (1946). — Méhes, Gy., L. Decsi u. S. Kovács: Acta Physiol. (Budapest) Suppl. **5**, 77 (1954). — Méhes, Gy., u. J. Pintér: Acta Physiol. (Budapest) **2**, 207 (1951). — Palladin, A. V.: Biochimija **17**, 456 (1952). — Pintér, J., Gy. Méhes u. L. Decsi: Acta Physiol. (Budapest) Suppl. **4**, 41 (1953). — Weil-Malherbe, H.: in Die Chemie und der Stoffwechsel des Nervengewebes. Berlin: Springer 1952.

Dr. L. Decsi, Pharmakol. Institut der Medizinischen Univ. Pécs, Rákóczi u. 2 (Ungarn)

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, S. 552—558 (1957)

Aus dem Laboratorium der Chirurgischen Universitätsklinik München

Verhinderung der Isonicotinyl-Isopropylhydrazid-(Iproniazid = Marsilid)-Hemmung der Monaminoxydase durch Blut in vitro

Von
F. Roewer und E. Werle

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 5. April 1957)

Nach Zeller u. a. (1952a) ist Isonicotinyl-Isopropylhydrazid (IIH) ein sehr stark wirksamer Hemmkörper der Monaminoxydase (Mo). Die Mo der Mitochondrien der Rattenleber wird in vitro durch $4 \cdot 10^{-5}$ m IIH noch zu 77% gehemmt. Isonicotinylhydrazid (INH) hemmt die Mo nicht oder nur sehr wenig (Zeller, 1952b). Bei gegebener IIH-Konzentration erreicht die Hemmwirkung gegenüber der Mo von Homogenaten, Mitochondrien und zellfreien Fermentpräparaten nach 6—12 min Inkubationszeit ihr Maximum (Zeller, 1955). Durch Dialyse wird das Ferment nicht oder nur wenig reaktiviert. Die IIH-Hemmung ist nicht kompetitiv. Nach Schayer (1953) ist IIH der einzige bisher bekannte Stoff, der die Mo auch in vivo sehr stark hemmt. Nach s.c. Verabreichung von IIH an Ratten ($5 \cdot 10^{-5}$ m/kg Körpergewicht) war die Mo der Leber noch 20 Std nach der Injektion vollkommen inaktiv; 5 Tage danach war die Mo-Aktivität der Leber wieder normal, wobei angenommen wird, daß das Ferment in dieser Zeit neu gebildet wurde (Zeller, 1955). Die IIH-Hemmung der Mo ist von besonderem Interesse, weil z. B. die Tatsache, daß IIH-Verabreichung zu akuten Psychosen führen kann (Conrad u. Scheib, 1953) oder die Aufhebung der sedativen Wirkung von Reserpin durch gleichzeitige IIH-Gaben mit der Mo-Hemmung durch IIH in Verbindung gebracht wird. Man nimmt an, daß die sedative Wirkung des Reserpins in der Weise zustande kommt, daß Reserpin die Serotonin-Depots des Gehirns mobilisiert und daß das freiwerdende Serotonin anschließend durch die Mo des Gehirns abgebaut wird. Dieser Abbau wird durch IIH verhindert. Es kommt so zur Anhäufung von Serotonin im Gehirn und zur Ausbildung psychotischer Erscheinungen, ähnlich wie sie durch Lysergsäurediäthylamid hervorgerufen werden (Pletscher, 1956a; Shore, 1955; Bogdanski, 1956; Pletscher, 1956b). Im folgenden wird nun gezeigt, daß die IIH-Hemmung der Mo durch Blut verhindert werden kann.

Experimenteller Teil

Material. Als *Enzympräparat* wurde meist eine nach Schneider u. Hogeboom (1950) aus Meerschweinchenleber in 0,25 m Saccharoselösung erhaltene Mitochondrien-Suspension, gelegentlich auch ein Meerschweinchenleber-Homogenat (erhalten durch Homogenisieren von je 1 g Leber in 3 ml 0,07 m Phosphatpufferlösung p_H 7,2) ferner eine gereinigte Mo aus Rinderleber verwendet. Als *Substrat* wurde Tryptamin-, seltener Tyraminhydrochlorid „Roche", jeweils in einer Endkonzentration von $2{,}1 \cdot 10^{-3}$ m in 0,07 m Phosphatpuffer p_H 7,2 verwendet. Im gleichen Puffer wurde eine $0{,}8 \cdot 10^{-3}$ m *IIH*-[1] und *INH*-Lösung bereitet. Menschliches *Blut* wurde meist in Form von Blutkonserven, einige Male auch in Form von defibriniertem Cubitalvenenblut verwendet. Blut von Hunden wurde aus der Vena femoralis bei mit Pernocton narkotisierten Tieren entnommen und dann defibriniert.

Methoden. Die Messung der Mo-Aktivität erfolgte jeweils an Hand der Messung des O_2-Verbrauches und der NH_3-Entwicklung in Gegenwart von Substrat.

1. Messung des Sauerstoffverbrauches. *Versuchsbeispiel. Im Hauptraum.* 1 ml Fermentpräparat + 0,5 ml 0,07 m Phosphatpuffer p_H 7,2 + 0,5 ml IIH, Endkonzentration $0{,}8 \cdot 10^{-3}$ m + 1 ml Blut + 0,5 ml KCN, Endkonzentration $1{,}5 \cdot 10^{-3}$ m. *Im Kipper.* 0,5 ml Substratlösung, Endkonzentration $2{,}1 \cdot 10^{-3}$ m. Der *Zentralraum* war jeweils mit 0,25 ml $2{,}4 \cdot 10^{-2}$ m KCN in 10%iger KOH beschickt. Gesamtvolumen 4 ml; Luftatmosphäre; 37° C. Vor Einkippen des Substrates wurde jeweils 30 min lang mit IIH vorinkubiert. Die Versuche wurden nach 90 min durch Alkoholzugabe gestoppt. Jeder Hauptversuch wurde ergänzt durch Kontrollansätze, in denen die auf ihre Fähigkeit zur „Bindung" des IIH zu prüfende Substanz fehlte, die aber IIH enthielten, ebenso durch Ansätze mit Enzym und Substrat allein, sowie Ansätze der gleichen Zusammensetzung, jedoch ohne Substrat. Alle Ansätze wurden auf das gleiche Endvolumen mit 0,07 m Phosphatpuffer p_H 7,2 aufgefüllt. Bei Versuchen mit Hämin wurde bei p_H 9,1 gemessen, weil Hämin im neutralen Milieu schwer löslich ist. Dabei wurde 0,07 m Boratpuffer verwendet. Die Ansätze ohne Substrat verbrauchten im Mittel mit Mitochondrien-Präparaten 7%, mit Leberhomogenaten 30% und mit der gereinigten Mo 12% der O_2-Menge des Hauptversuches. Bei Messungen unter isotonischen Bedingungen waren IIH, KCN und das Substrat in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, die Phosphatpuffer-Konzentration war 0,2 m.

2. Messung der Ammoniak-Entwicklung. Nach Messung des Sauerstoffverbrauches wurden die Ansätze mit 1 ml 96%igem Äthylalkohol versetzt und im Inhalt des Hauptraumes Ammoniak nach Conway u. Byrne (1933) bestimmt. Vorlage 1 ml 0,1 n Schwefelsäure, Rücktitration der überschüssigen Schwefelsäure nach mindestens 12 Std Stehen bei Zimmertemperatur mit 0,025 n NaOH. In Blindversuchen wurde sichergestellt, daß IIH und INH unter den Bedingungen der Bestimmung kein Ammoniak entwickeln. Die NH_3-Leerwerte betrugen im Mittel bei Ansätzen mit Mitochondrien-Fraktionen 30%, mit Leberhomogenaten 60% und mit gereinigter Mo 40% der NH_3-Werte der Hauptversuche.

3. Gesamt-N-Bestimmungen wurden nach Kjeldahl ausgeführt, wobei die gleichen Meßlösungen wie zur NH_3-Bestimmung verwendet wurden.

Ergebnisse

Die Versuchsergebnisse werden als „Spezifische Aktivität" (Spez. Akt. für O_2 u. NH_3) für Sauerstoffverbrauch und Ammoniakentwicklung angegeben, d. h. in Einheiten des Sauerstoffverbrauches oder der NH_3-Entwicklung pro mg Gesamt-N.

[1] Wir danken der Deutschen Hoffmann-La Roche AG, Grenzach, Baden, für die Überlassung von „Marsilid"-Phosphat.

Tabelle 1. *Einfluß von Blut und einigen Blutkomponenten auf die Hemmung der Monaminoxydase durch Isonicotinyl-Isopropylhydrazid* IIH- und INH-Konzentrationen jeweils $0{,}8 \cdot 10^{-3}$ m; Ansätze mit IIH +, Ansätze ohne IIH —. Die beiden Werte in ( ) unter der Rubrik „Substrat" bedeuten jeweils spezifische Aktivitätswerte für den Sauerstoffverbrauch und die Ammoniakentwicklung (s. d. Text) der Mo-Ansätze in Abwesenheit von IIH

Enzymquelle	Substrat	Zusätze		Spez. Aktivität	
		IIH	Blut und andere	O_2	NH_3
Gereinigte Mo aus Leber .	Tryptamin	—	—	2	2
Mitochondrien-Suspension	Tryptamin	—	—	1,1	1,2
Mitochondrien-Suspension	Tyramin	—	—	1,0	1,3
Leber-Homogenat	Tyramin	—	—	0,6	0,7
Gereinigte Mo	Tryptamin (2; 2)	+	—	0	0
Mitochondrien-Suspension	Tryptamin (1,0; 1,1)	+	—	0	0
Leber-Homogenat	Tyramin (0,6; 0,7)	+	—	0	0
Leber-Homogenat	Tyramin (0,9; 1,0)	+	—	0,8	0,9
Leber-Homogenat	Tyramin (0,6; 0,7)	INH	—	0,6	0,7
—	Tryptamin	+	Gesamtblut (Mensch) hypotonisch	0,1	0
Gereinigte Mo	Tryptamin (2; 2)	+	Gesamtblut, hypertonisch	2	2
Gereinigte Mo	Tryptamin (2; 2)	+	Gesamtblut, hypotonisch	1,2	1,7
Mitochondrien-Suspension	Tyramin (0,9; 1,0)	+	Gesamtblut (Hund) hypotonisch	1,2	1,3
Gereinigte Mo	Tryptamin (2; 2)	+	Gesamtblut (Mensch) isotonisch	1,4	1,7
Gereinigte Mo	Tryptamin (2; 2)	+	Serum (Hund)	0	0
Mitochondrien-Suspension	Tyramin (1,1; 1,4)	+	Serum (Mensch)	0,1	0
Gereinigte Mo	Tryptamin (2; 2)	+	Gewaschene Blutzellen	1,1	1,2
Mitochondrien-Suspension	Tyramin (1,0; 1,3)	+	Hämolysat (mit dest. W. aus einmal gewaschenen Blutzellen erhalten)	1,1	1,2

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Mitochondrien-Suspension	Tryptamin (1,1; 1,3)	+	Hämoglobin (25—30 mg/Ansatz)	0	0
Mitochondrien-Suspension	Tryptamin (1,1; 1,3)	+	Hämin (2, 5 u. 10 mg/Ansatz)	0	0
Mitochondrien-Suspension	Tyramin (1,0; 1,3) (1,0; 1,4)	+	Hämolysat, 1 Std auf 56—58° C erwärmt	1,2 0,6	1,2 0,8
Mitochondrien-Suspension	Tyramin (1,0; 1,3)	+	Hämolysat (10 ml) 5 min im Reagensglas in siedendes Wasserbad gebracht, dann 2 ml Puffer zugegeben	0,5	0,6
Mitochondrien-Suspension	Tryptamin (1,0; 1,2)	+	Außendialysat von Hämolysat (Dialyse 30 Std bei + 3° C gegen das gleiche Volumen dest. W.)	0	0
Mitochondrien-Suspension	Tryptamin (1,0; —)	+	„Stromata"-Suspension (erhalten durch 1 Std hochtouriges Zentrifugieren bei 0° C, Dekantieren des Überstandes und 3mal. Waschen d. Rückstandes m. Phosphatpuffer, p_H 7,2)	0	—
Mitochondrien-Suspension	Tryptamin (1,1; 1,3)	+	Eisen(III)chlorid (10^{-3} m)	0	0
Mitochondrien-Suspension	Tyramin (1,1; 1,3)	+	Pyridoxal-5′-Phosphat (200 γ/Ansatz)	0	0
Mitochondrien-Suspension	Tyramin (0,6; 1,3) (0,8; 1,2)	+	Hämolysat zugekippt *nach* Inkubation des Enzyms mit Substrat und IIH[1]	0,1 0,1	0,3 0,6
Mitochondrien-Suspension	Tyramin (0,6; 1,3)	+	IIH in Hämolysat gelöst in Gegenwart von Enzym und Substrat inkubiert	0,8	1,2
Mitochondrien-Suspension	Tyramin (0,6; 1,3)	+	IIH in Hämolysat gelöst u. dann zu dem mit Substrat vorinkubierten Enzym zugekippt	0,8	1,3
Mitochondrien-Suspension	Tyramin (0,2; 0,6)	+	IIH in einer Blutzellensuspension gelöst und in Gegenwart von Enzym und Substrat vorinkub.	0,6	1,4
Mitochondiren-Suspension	Tyramin (0,2; 0,6)	+	IIH in einer Blutzellensuspension gelöst u. zu d. m. Substrat vorinkubierten Enzym zugekippt	0,8	1,6

[1] Bei diesem und den folgenden Versuchen wurde jeweils nur 15 min lang vorinkubiert.

1 O_2-Einheit entspricht derjenigen Enzymmenge, die nach Zusatz des Substrates 10 μl Sauerstoff unter den angegebenen Versuchsbedingungen verbraucht.

1 NH_3-Einheit entspricht derjenigen Enzymmenge, die nach Zusatz des Substrates während 90 min unter den angegebenen Versuchsbedingungen 10 γ Ammoniak entwickelt.

Abb. 1 gibt den zeitlichen Verlauf des Sauerstoffverbrauchs eines Versuchsansatzes mit gereinigtem Mo-Präparat, eines Ansatzes mit

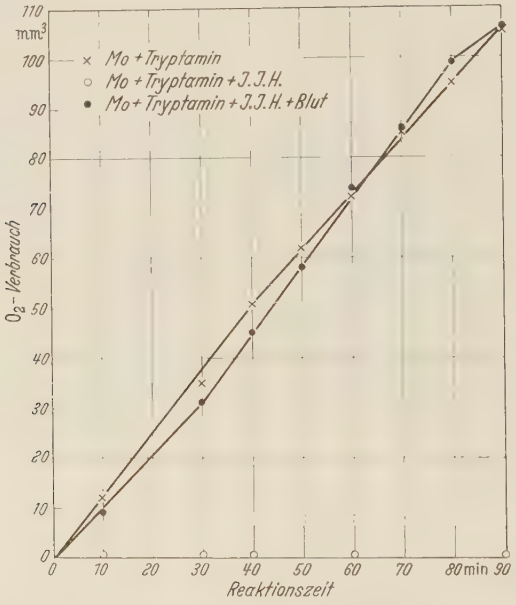


Abb. 1. Verhinderung der Isonicotinyl-Isopropylhydrazid-Hemmung von gereinigter Monaminoxydase durch Blut

Mo + IIH und eines Ansatzes mit Mo, IIH und 1 ml Hundeblut, wieder. Substrat war in jedem Fall Tryptamin. Die Kurven lassen erkennen, daß die Mo-Aktivität in Gegenwart von IIH aufgehoben ist und daß Blut die Inaktivierung verhindert. Aus den in Tab. 1 aufgezeichneten Versuchsergebnissen geht hervor, daß Blut in iso- und hypotonischem Milieu die Hemmung der Mo durch IIH verhindert oder stark abschwächt und daß dafür die Blutkörperchen verantwortlich sind und nicht das Blutserum. Die IIH-Hemmung wird auch durch gewaschene Blutkörperchen und durch wäßrige Hämolysate verhindert. Außendialysate der Hämolysate sind ohne Wirkung, ebenso gewaschene Stromata, Hämoglobin, Hämin und Eisen-III-Chlorid. Die letztgenannte Verbindung ist allerdings bei dem p_H, in dem die

Messung durchgeführt wurde, unbeständig. Die Fähigkeit der Hämolysate, die IIH-Hemmung zu verhindern, wird bei 1stündigem Erwärmen auf 56—58° C merklich, bei 5 min langen Belassen in einem siedenden Wasserbad stark abgeschwächt. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen wird in vitro IIH innerhalb von rund 15 min durch Blut „entgiftet". Eine bereits eingetretene IIH-Hemmung der Mo wird durch Blut nicht aufgehoben.

Diskussion

Nach den mitgeteilten Ergebnissen reagiert zu Blut gegebenes IIH mit einem in den cellulären Elementen befindlichen, hochmolekularen Agens, vermutlich von Proteinnatur, wodurch IIH seine starke Hemmwirkung gegenüber der Mo verliert. Von einer in ein Versuchstier i.v. injizierten IIH-Menge dürfte daher nur ein Bruchteil unverändert in die Leber gelangen. Zur totalen Hemmung der Mo in vivo genügten beim Hund z. B. 20 mg/kg. Diese, und mehr als die doppelte IIH-Menge könnte innerhalb von etwa 15 min durch das Blut des Versuchstieres *in vitro* vollkommen gebunden werden; offenbar reicht in vivo die kurze Verweildauer des IIH in der Blutbahn hierfür nicht aus.

Tab. 1 enthält einen Versuch mit Roh-Leberhomogenat, bei dem die Mo durch IIH praktisch nicht gehemmt wurde. Auch Zeller (1955) beobachtete gelegentlich, daß IIH die Mo von Rohhomogenaten weniger stark hemmt, als die von Mitochondrien-Präparaten und von zellfreiem Enzym. Es wird in diesem Zusammenhang von Schutzfaktoren gesprochen, die bei der Gewinnung von Mitochondrien-Suspensionen und zellfreien Mo-Präparaten entfernt werden. Auf Grund der hier mitgeteilten Ergebnisse halten wir es für möglich, daß das Ausbleiben der IIH-Hemmung in den erwähnten Versuchen auf die Anwesenheit von größeren Mengen Blut in den Rohhomogenaten zurückzuführen ist.

Ein Hinweis dafür, daß IIH in vivo angegriffen wird, ergibt sich aus folgenden Beobachtungen von Davison (1956): Cysteinsulfinsäure-Decarboxylase aus Rattenleber wird in vitro durch IIH nicht gehemmt, wohl aber durch INH, dessen freie Aminogruppe mit Pyridoxal-5'-Phosphat, dem Coferment der Decarboxylase, eine Schiffsche Base bildet. Wird dagegen IIH in vivo in hohen Dosen zugeführt, so kommt es zu einer Hemmung der Cysteinsulfinsäure-Decarboxylase. Es wird vermutet, daß IIH in vivo zu INH umgewandelt wird.

Zusammenfassung

Isonicotinyl-Isopropylhydrazid (IIH) verliert in vitro bei Inkubation mit Blut seine sehr starke Fähigkeit zur Hemmung der Monaminoxydase. Das für diesen Effekt verantwortliche Prinzip findet sich in den Formelementen des Blutes — wahrscheinlich in den Erythrocyten; es ist

hochmolekular und thermolabil. Die durch IIH bereits gehemmte Mo wird durch Blut nicht reaktiviert. Auf die Bedeutung der Verhinderung dieser Hemmung wird hingewiesen.

Literatur

Bogdanski, D. F., H. Weissbach and S. Udenfriend: Federat. Proc. **15**, 402 (1956). — Conrad, K., u. F. Scheib: Dtsch. med. Wschr. **1953**, 604. — Conway, E. J., and A. Byrne: Biochemic. J. **27**, 419 (1933). — Davison, A. N.: Biochimica et Biophysica Acta **19**, 131 (1956). — Pletscher, A., P. A. Shore and B. B. Brodie: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **116**, 46 (1956). — Pletscher, A.: Experientia (Basel) **12**, 479 (1956). — Schayer, R. W.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **84**, 60 (1953). — Schneider, W. C., and G. H. Hogeboom: J. of Biol. Chem. **183**, 123 (1950). — Shore, P. A., L. S. Silver and B. B. Brodie: Science (Lancaster, Pa.) **122**, 284 (1955). — Zeller, E. A., J. Barsky, J. R. Fouts, W. F. Kirchheimer u. L. S. van Orden: Experientia (Basel) **8**, 349 (1952). — Zeller, E. A., and J. Barsky: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **81**, 459 (1952). — Zeller, E. A., J. Barsky and E. R. Berman: J. of Biol. Chem. **214**, 267 (1955).

Prof. Dr. E. Werle, Laboratorium der Chirurgischen Univ.-Klinik, München, Nußbaumstr. 20

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 230, 559—593 (1957)

Aus dem Gewerbehygienisch-Pharmakologischen Institut der Badischen Anilin- und Soda-Fabrik Ludwigshafen am Rhein (Leiter: Prof. Dr. med. H. Oettel)

Vergleichende Prüfung von 14 cytostatisch wirksamen Produkten an 7 Tiertumoren

Von
H. Oettel und G. Wilhelm

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. Februar 1957)

Bei der pharmakologischen oder toxikologischen Prüfung neuer chemischer Stoffe sind Rückschlüsse aus den Ergebnissen von Tierversuchen auf die vermutliche Wirkung am Menschen im allgemeinen nur möglich bei gleichzeitiger Prüfung ähnlicher Stoffe, deren Wirkung am Menschen bereits einigermaßen bekannt ist („Standardsubstanzen"). Ein solcher Rückschluß vom Tierversuch auf den Menschen wird aber äußerst problematisch, wenn es Vergleichssubstanzen mit der fraglichen Wirkung am Menschen noch gar nicht gibt. Das trifft besonders für die meisten Untersuchungen auf dem Krebsgebiet zu.

Gerade auf diesem Gebiet werden aber mit einer erstaunlichen Kühnheit direkte Rückschlüsse vom Tierversuch auf den Menschen gewagt. Stoffe, die bei irgendeiner Applikationsweise an irgendeiner Tierart irgendwelche spezifische (oder auch unspezifische!) tumorähnliche Veränderungen erzeugen, werden als „cancerogen" bezeichnet, und es wird als fast selbstverständlich vorausgesetzt, daß sie auch beim Menschen — noch dazu in kleinsten Dosen durch irreversible Summation ihrer Wirkung — Krebs erzeugen müssen. Umgekehrt werden aus den mehr oder weniger starken Hemmwirkungen irgendwelcher Substanzen an irgendeiner — meist leicht zu beeinflussenden — Tumorzellart Schlüsse gezogen auf die zu erwartende antineoplastische Wirkung beim Menschen. Beides muß als Kurzschluß bezeichnet werden.

Daß auf dem Wege zur Chemotherapie des Krebses der Prüfung eines Stoffes am Tumortier eine hervorragende Bedeutung zukommt, steht außer Zweifel. *Welche* Tiertumoren sich jedoch als „Modelle" für die verschiedenen menschlichen Tumoren am besten eignen, ist bisher noch völlig unbekannt.

Im Laufe der letzten 10 Jahre wurden mehrere neue Substanzen, deren cytostatische Wirkung im Tierexperiment gefunden worden war, bereits klinisch eingesetzt. Nachdem also inzwischen über deren Wirkung

am Menschen gewisse Erfahrungen vorliegen, scheint es angebracht, gerade diese Substanzen als *Vergleichsprodukte* bei der Entwicklung weiterer Antineoplastica zu benutzen.

Auf die Notwendigkeit der gleichzeitigen Prüfung solcher „Standardsubstanzen" bei der Untersuchung neuer Cytostatica haben wir schon wiederholt hingewiesen (Oettel, 1954 und 1954a; Oettel und Wilhelm, 1954). Wie bei pharmakologischen und toxikologischen Prüfungen allgemein werden die Ergebnisse von Tierversuchen aus verschiedenen Laboratorien erst über die Befunde mit Standardsubstanzen vergleichbar. Daß auch die experimentelle Krebsforschung in dieser Hinsicht auf eine exakte pharmakologische Basis gestellt wird, ist um so mehr erforderlich, als sich erfahrungsgemäß sogar *derselbe* Impftumor in verschiedenen Laboratorien recht verschieden entwickeln und in seiner Empfindlichkeit gegen Cystotatica ändern kann (Stock, 1955, und pers. Mitt.).

Werden bereits klinisch verwendete Antineoplastica an *mehreren* Tiertumoren geprüft, so kann man aus einer solchen vergleichenden Untersuchung nicht nur erkennen, *welche* Tiertumoren durch Antineoplastica bestimmter Konstitution *überhaupt* bzw. *wie stark* sie beeinflußt werden, sondern es ist aus solchen vergleichenden Untersuchungen auf breiter Basis vielleicht auch schon ein vorsichtiger Rückschluß möglich auf die mutmaßliche Wirkung ebenso breit untersuchter neuer Produkte am Menschen.

Ein Beitrag zur Kenntnis der Wirkung einiger bekannter Antineoplastica im Tierversuch wird in der vorliegenden Arbeit gegeben. Sie ist eine Fortsetzung und Erweiterung von Arbeiten, über die wir bereits im Dezember 1954 berichteten und die sich mit der Prüfung einiger Cytostatica an einem kleinen „Tumorspektrum" aus 2 Mäuse- und einem Rattentumor beschäftigt hatten.

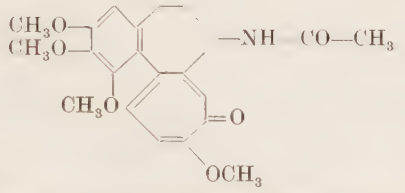
Inzwischen haben wir zu unseren Untersuchungen als Testobjekte weitere Tiertumoren und als Testsubstanzen weitere Cytostatica herangezogen. Das zu den jetzt vorliegenden Untersuchungen verwendete *Tumorspektrum* besteht aus 3 Mäusetumoren (Sarkom 37, Crockersarkom 180 und Ehrlichscher Mäuseascitestumor) und 4 Rattentumoren (Walker-Carcinosarkom 256, Benzpyrensarkom, Methylcholanthrensarkom, Yoshida-Ascitessarkom).

Standardsubstanzen. Als Standardsubstanzen bei der Prüfung neuer, in der BASF synthetisierter Produkte dienten 13 bekannte, in den verschiedenen Laboratorien der Welt bereits an einem oder mehreren Tumoren untersuchte und größtenteils bereits klinisch angewandte Cytostatica von verschiedener chemischer Struktur: 2 Colchicine, 1 Urethan, 2 Formamide, 2 bifunktionelle Butanderivate, 1 Purinantagonist, 1 Antibioticum, 2 N-Lost-Derivate und 2 polyfunktionelle aromatische Äthylenimine.

Das Ziel dieser Untersuchungen auf so breiter Basis, d. h. unter Verwendung *mehrerer* Impftumoren und *vieler* Vergleichssubstanzen, war einmal, zu einem kritischen Urteil über die *Wirkungsbreite der einzelnen Cytostatica* zu kommen und zum anderen eine Aussage über die *Ansprechbarkeit der einzelnen Tiertumoren* gegenüber verschiedenen Cytostatica, d. h. über die Schärfe des betreffenden Testes, zu ermöglichen.

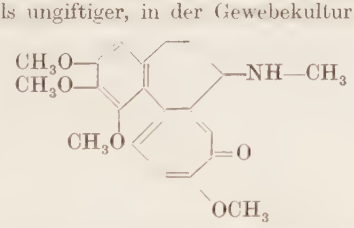
Im einzelnen wurden folgende Vergleichssubstanzen untersucht, die meist in Form der betr. Handelsprodukte fremder Firmen vorlagen, teils aber auch in der BASF Ludwigshafen hergestellt worden waren:

1. Colchicin. Colchicin, das Hauptalkaloid der Herbstzeitlose, ist eines der am längsten bekannten Cytostatica. Seine mitosehemmende Wirkung wurde schon 1889



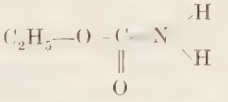
von Pernice und 1890 von Jakobj nachgewiesen. Alle Versuche, das Produkt in die Therapie neoplastischer Erkrankungen einzuführen, scheiterten jedoch an seiner äußerst geringen therapeutischen Breite (Paul u. Mitarb., Kneedler).

2. Desacetylmethylcolchicin („Demecolcin"). Desacetylmethylcolchicin ist ein 1950 von Santavy u. Reichstein isoliertes Nebenalkaloid der Herbstzeitlose, in dem die Acetylgruppe des Colchicins durch eine Methylgruppe ersetzt ist. Nachdem es sich im Tierversuch als ungiftiger, in der Gewebekultur jedoch als ebenso stark



mitosehemmend erwiesen hatte wie Colchicin (Schär, Loustalot u. Gross), wurde es 1953 in Deutschland von Bock u. Gross, in der Schweiz von Moeschlin u. Mitarb. in die Therapie eingeführt. Es hat sich vor allem bei der chronischen, gelegentlich auch bei der akuten myeloischen Leukämie bewährt, während es bei lymphatischen Leukämien, Carcinomen und Sarkomen versagte.

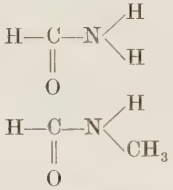
3. Äthylurethan. Urethan ist als Cytostaticum fast ebenso lange bekannt wie Colchicin: Schon 1910 wurde seine mitosehemmende Wirkung von Warburg am Seeigelei nachgewiesen. Erst 1946 wurde das Produkt jedoch auf Grund seiner von



Haddow u. Sexton im Tierversuch beobachteten tumorhemmenden Wirkung in die Therapie neoplastischer Erkrankungen eingeführt (Paterson u. Mitarb.), wo es sich bei der Behandlung der chronischen myeloischen und lymphatischen Leukämie und der Lymphogranulomatose als vorübergehend wirksam erwies (Heilmeyer).

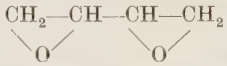
Wegen seiner starken Nebenwirkungen (Schwindelgefühl, Schläfrigkeit), der Möglichkeit von Organschädigungen (Leber) und der Gefahr tödlicher aplastischer Anämien bei Dauerbehandlung wird es jedoch heute — außer bei der Myelombehandlung — kaum mehr angewandt (Schulten u. Peibilla).

4. Formamid und **5. N-Methylformamid.** Beide Produkte erwiesen sich bei Untersuchungen des Sloan-Kettering-Instituts am Crockersarkom 180 als einzige unter etwa 60 Formamiden als antineoplastisch wirksam (Clarke u. Mitarb., 1953;



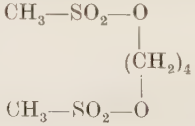
Stock, 1954). Sie kommen zwar nach Ansicht der genannten Autoren wegen ihrer Hepatotoxicität für eine therapeutische Verwendung am Menschen nicht in Frage, sind aber vor allem deshalb interessant, weil sie im Nucleinsäurestoffwechsel als C_1-Körper (Rauen) bzw. durch deren Verdrängung eine Rolle spielen könnten.

6. Butadiendioxyd. Butadiendioxyd wurde 1950 bei ausgedehnten Untersuchungen der Arbeitsgruppe Hendry, Homer, Rose u. Walpole (Imperial Chemical Industries) am Walker-Tumor der Ratte als besonders wirksamer Vertreter



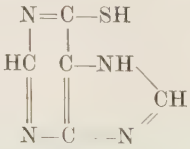
einer Reihe von Bis-Epoxyden erkannt (Rose u. Mitarb., 1950; Hendry u. Mitarb., 1951). Dieses Produkt wurde jedoch bisher klinisch nicht geprüft, da nach Ansicht der genannten Autoren seine geringe therapeutische Breite im Tierversuch eine Anwendung am Menschen nicht rechtfertigt.

7. 1,4-Dimethansulfonoxy-butan. („Myleran"). Das Produkt ist ebenso wie Butadiendioxyd ein bifunktionelles Butanderivat. Es wurde 1953 auf Grund seiner wachstumshemmenden Wirkung am Walker-Tumor von Haddow u. Timmis in die



Klinik eingeführt, wo es sich inzwischen bei der Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie einen festen Platz sicherte. Bei akuten Leukämien, lymphatischen Leukämien, Lymphogranulomatose, Lymphosarkom und anderen Neoplasmen hat es sich dagegen nicht bewährt (Galton; Galton u. Till; Bollag, 1953).

8. 6-Mercaptopurin. Etwa zur gleichen Zeit wie Myleran in England wurde in Amerika 6-Mercaptopurin entwickelt (Clarke u. Mitarb., 1953a; Philips u. Mitarb.

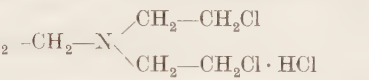


1953). Das Produkt - ein Purinantagonist — wird vor allem zur Behandlung akuter Leukämien (insbesondere von Kindern) empfohlen, die es besser als Erwachsene vertragen sollen. Auch bei chronischen myeloischen Leukämien führt es gelegentlich

zu Remissionen, während es bei chronischen lymphatischen Leukämien, Lymphogranulomatose, Sarkomen und Carcinomen keine Wirkung besitzt (Burchenal u. Mitarb., 1953 und 1954).

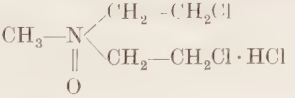
9. Actinomycin C. Das erste Antibioticum, bei dem eine deutliche cytostatische Wirkung nachgewiesen werden konnte, war Actinomycin C, ein Chromopeptid, dessen chemische Konstitution im einzelnen noch nicht geklärt ist. Es wurde 1949 von Brockmann u. Grubhofer aus Streptomyces chrysomallus isoliert, 1952 von Hackmann im Tierversuch als antineoplastisch wirksam erkannt und im gleichen Jahr von Schulte erstmals klinisch eingesetzt. Sein ausschließliches Indikationsgebiet ist die Lymphogranulomatose. Die Wirkung des Produktes bei dieser Erkrankung wird jedoch von den einzelnen Autoren recht verschieden beurteilt: Während Schulte, Schulte u. Lings, sowie Martin über günstige Erfahrungen berichten, sahen Bertrand-Fontaine u. Mitarb., Croizat, Huguenin u. Mitarb., Martin u. Munier wenig überzeugende und Bollag u. Essellier sogar keinerlei günstige Resultate. Die übrigen im Tierversuch geprüften Actinomycine haben bisher keine klinische Bedeutung erlangt.

10. Trichlor-triäthylamin-chlorhydrat (N-Lost). Die antineoplastische Wirkung von N-Lost wurde etwa zur gleichen Zeit (1942/43) in Amerika und England entdeckt. Sein Hauptindikationsgebiet ist heute die Behandlung der Lymphogranulomatose. Daneben hat es gelegentlich auch bei Lymphosarkomen, Retothelsarkomen



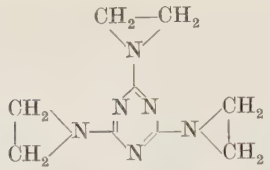
und manchen Formen des Lungenkrebses vorübergehend eine günstige Wirkung (Heilmeyer, Schulten u. Pribilla). Seine klinische Anwendbarkeit wird allerdings durch oft unerträgliche Nebenwirkungen erheblich eingeschränkt.

11. Methyl-bis-(β-chloräthyl)-amin-N-oxyd-hydrochlorid (N-Oxyd-Lost). Das 1946 von Stahmann u. Bergmann synthetisierte Produkt wurde 1950 von Yoshida u. Ishidate im Tierversuch als weniger giftig und stärker antineoplastisch wirksam erkannt als N-Lost und daraufhin in Japan in die Klinik eingeführt. Nach den bisherigen Erfahrungen japanischer Forscher soll es therapeutisch dem N Lost



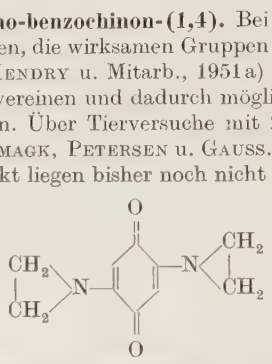
zumindest gleichzusetzen, ihm aber hinsichtlich seiner Verträglichkeit überlegen sein (Kimura u. Mitarb., Kurokawa). In Deutschland, wo noch wenig klinische Erfahrungen mit N-Oxyd-Lost vorliegen (Dudik, Hörlin u. Schmitt), wurde das Produkt von Druckrey (1956) an 3 Rattentumoren untersucht und als ausgezeichnet wirksam befunden. Ob allerdings auf Grund der von Druckrey errechneten Faktoren („Sicherheitsindex", „Kumulationsrest", „therapeutischer Index", „R-Wert" usw.) irgendwelche Voraussagen auf die Wirkung des Produktes beim Menschen gemacht werden können, bleibt offen.

12. 2,4,6-Triäthylenimino-1,3,5-triazin (Triäthylenmelamin – TEM). Die tumorhemmende Wirkung von TEM, das erstmals in den Farbwerken Hoechst hergestellt wurde und seit Jahren als Textilhilfsmittel bekannt ist, wurde 1950 von Rose, Hendry u. Walpole festgestellt und wenig später von Burchenal u. Mitarb. (1950) bestätigt. Die ersten klinischen Versuche wurden in USA durchgeführt (Karnofsky u. Mitarb.). TEM hat sich vor allem bei der Behandlung der chronischen lymphatischen Leukämie bewährt, wo es allen anderen Präparaten überlegen



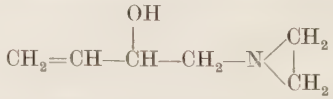
sein soll, sowie bei der Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie, nicht dagegen bei akuten Leukämien, Sarkomen und Carcinomen (Heilmeyer; Schulten u. Pribilla).

13. 2,5-Bis-äthylenimino-benzochinon-(1,4). Bei der Herstellung dieser Verbindung war bezweckt worden, die wirksamen Gruppen der als wachstumshemmend bekannten Äthylenimine (Hendry u. Mitarb., 1951a) und Chinone (Lehmann) in einem einzigen Molekül zu vereinen und dadurch möglicherweise die antineoplastische Wirkung zu verstärken. Über Tierversuche mit 2,5-Bis-äthylenimino-benzochinon berichteten 1954 Domagk, Petersen u. Gauss. Mitteilungen über klinische Versuche mit diesem Produkt liegen bisher noch nicht vor.



Das ebenfalls von Domagk im Tierversuch als cytostatisch wirksam befundene 3,6-Bis-alkoxyderivat von 2,5-Bis-äthylenimino-benzochinon-(1,4) (E 39) soll dagegen nach einer Publikation von Wolf u. Gerlich bei fortgeschrittenen Krebsfällen eine palliative Wirkung gezeigt haben.

14. 1-Äthylenimino-2-oxybuten (3). Von den weit über 100 Stoffen der verschiedensten chemischen Struktur, die in der BASF Ludwigshafen im Laufe der letzten Jahre hergestellt und auf ihre etwaige antineoplastische Wirkung geprüft wurden, soll nur eines der wirksamsten Produkte angeführt werden. Über die ersten



Tierversuche mit diesem von Vierling hergestellten, früher mit der Versuchsnummer IV/148, jetzt als „*Tetramin-BASF*" bezeichneten Monoäthylenimin haben wir bereits im Dezember 1954 berichtet. Das Produkt ist eine farblose, klare Flüssigkeit, die in Wasser, pflanzlichen Ölen, Propylenglykol, Polyäthylenglykol 400 usw. in jedem Verhältnis löslich und selbst bei Zimmertemperatur praktisch unbeschränkt lange haltbar ist.

Inzwischen wurde die biologische Wirkung von Tetramin auch von anderer Seite experimentell untersucht. Raettig u. Uecker stellten ebenso wie wir (Oettel u. Zeller) fest, daß das Produkt Bakteriophagen inaktiviert. Von Friederici wurde an Fibroblastenkulturen in Konzentrationen von 1 : 4 bis 1 : 40000 eine vollständige Wachstumshemmung, an Knochenmarkskulturen (Ratte und Meerschweinchen) bis zu einer Konzentration von 1 : 400000 nur eine Ausschwemmung von Rundzellen ohne echtes Zellwachstum beobachtet. Nach diesen Versuchen greift Tetramin in den Stoffwechsel des Ruhekerns ein und verhindert den Eintritt in die Mitose. Klinische Versuche wurden u. a. von Schulze durchgeführt, der an anderer Stelle über seine bisherigen Ergebnisse berichtet.

Versuche[1]

Zu sämtlichen Versuchen wurden Mäuse aus einer normalen (heterocygoten) Zucht im Gewicht von 18—22 g und Sprague-Dawley-Ratten im Gewicht von 90—120 g verwendet.

A. Vorversuche (Toxicitätsbestimmung)

Vor der Untersuchung auf antineoplastische Wirkung wurde die *akute Toxicität* jedes Produktes an der Maus bestimmt: Es wurde die Dosis festgestellt, nach deren einmaliger intraperitonealer Injektion 50% der untersuchten Tiere innerhalb von 8 *Tagen* sterben (LD 50). Als Lösungsmittel bzw. Suspensionsmittel diente jeweils Aqua. dest. oder physiol. Kochsalzlösung.

Ergebnis. Die LD 50 und ihre zufällige Schwankungsbreite nach Litchfield und Wilcoxon betrug für:

Colchicin	2,45	(1,75 — 3,43)	mg/kg
Desacetylmethylcolchicin	35	(28,2 —43,3)	„
Urethan	2400	(2100 — 2800)	„
Formamid	2450	(1940 — 3090)	„
Methylformamid	2800	(2290 — 3420)	„
Butadiendioxyd	31	(27,4 —35,0)	„
Dimethansulfonoxybutan	122	(102 — 146)	„
Mercaptopurin	420	(330 — 535)	„
Actinomycin C	1,11	(0,97— 1,28)	„
N-Lost	1,6	(1,4 — 1,9)	„
N-Oxyd-Lost	126	(107 — 149)	„
Triäthylenmelamin	3,0	(2,5 — 3,6)	„
Äthylenimino-benzochinon	29,5	(17,0 —51,3)	„
Äthylenimino-oxybuten	31	(28,0 —34,5)	„

Um die Maximaldosen festzustellen, die bei *wiederholter* Applikation an aufeinanderfolgenden Tagen Tumortieren ohne grobe Schädigung injiziert werden können, wurde anschließend für jedes Produkt die *subakute Toxicität* an Maus und Ratte bestimmt. Hierbei wurden Gruppen zu je 5 Mäusen oder 3 Ratten verwendet, denen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen einmal täglich Dosen intraperitoneal injiziert wurden, die zwischen $^1/_5$ und $^1{}_2$ der zuvor bestimmten LD 50 der Maus lagen. Die Tiere wurden täglich gewogen und 14 *Tage* lang beobachtet.

Auf Grund der Ergebnisse dieser Versuche wurden die Dosen für die Prüfung auf antineoplastische Wirkung festgelegt. Dabei war jedoch zu berücksichtigen, daß Tumortiere im allgemeinen gegenüber der toxischen Wirkung von Substanzen empfindlicher sind als gesunde Tiere und daß diese Empfindlichkeitssteigerung je nach Art des betreffenden Tumors verschieden sein kann.

[1] Frl. M. Neumann sei an dieser Stelle für ihre Assistenz bei der Durchführung der Versuche besonders gedankt.

B. Prüfung auf antineoplastische Wirkung

I. Allgemeine Versuchstechnik

Sämtliche Untersuchungen auf antineoplastische Wirkung, die weiter unten im einzelnen beschrieben werden, wurden nach einheitlichen Richtlinien durchgeführt: Da sich einerseits Angangsrate und Wachstumsgeschwindigkeit von Impftumoren häufig im Laufe der Zeit ändern und da sich andererseits auch *gleichzeitig* überimpfte Tumoren aus *verschiedenem* Ausgangsmaterial (d. h. aus Tumoren verschiedener Tiere) in ihrem Angehen und Wachstum unterscheiden können, haben wir grundsätzlich für *jeden* Versuch, also zur Prüfung jeder einzelnen Dosis der betreffenden Substanz, 10 Versuchs- *und* 10 Kontrolltiere verwendete, die alle mit dem *gleichen* Tumormaterial aus dem Tumor *eines* Tieres geimpft wurden.

Reichte bei festen Tumoren der Tumor *eines* Tieres ausnahmsweise nicht zur Überimpfung auf 20 Tiere aus, so wurde der Tumorbrei zweier Tiere gemischt, so daß auch in diesem Falle sämtliche Tiere der Versuchsserie ein *gleichartiges* Ausgangsmaterial überimpft bekamen. Genügte bei Ascitestumoren die Ascitesmenge eines Tieres ausnahmsweise nicht zur Überimpfung auf alle Tiere der Versuchsserie, so wurde Ascites von 2 Ausgangstieren entnommen und die Hälfte (= je 5) der Versuchs- und Kontrolltiere mit dem Ascites eines Ausgangstieres geimpft. Auch in diesem Falle war also das verwendete Tumormaterial für Kontroll- und Versuchsgruppen gleich.

Um später aus den an *verschiedenen Tumoren* gewonnenen Versuchsergebnissen möglichst exakte Rückschlüsse auf die Beeinflußbarkeit der einzelnen Tiertumoren ziehen zu können, wurden sämtliche Prüfungen an den festen Mäusetumoren ebenso wie die an den festen Rattentumoren nach der *gleichen* Versuchs- und Auswertungstechnik durchgeführt. Sie werden weiter unten unter B II im Zusammenhang besprochen. Weitgehend gleich war auch die Versuchstechnik bei den „flüssigen" Tumoren (Mäuseascitestumor und *Yoshida*-Ascitestumor der Ratte), die unter B III besprochen werden.

Um für einen Vergleich der *verschiedenen Cytostatica* die gleichen Bedingungen der Applikationsweise und Dosierung zu schaffen, wurden alle Produkte im „Screeningtest" *intraperitoneal* verabreicht und grundsätzlich *bis zu maximal verträglichen Dosen* untersucht, wobei die Dosenabstände im allgemeinen einer geometrischen Reihe entsprachen.

Die *Auswertung* erfolgte bei den beiden *Ascitestumoren* statistisch auf Grund der Lebensdauer der Tumortiere sowie auf Grund der Ascitesmenge beim Tod.

Da bei *festen Tumoren* die Lebensdauer der Tumortiere außerordentlich schwankt, wurde sie zur Beurteilung nicht herangezogen. Die Auswertung erfolgte in diesem Falle statistisch auf Grund des *Tumorgewichts* der am gleichen Tag getöteten Tiere. Diese Methode hat sich uns wegen ihrer größeren Genauigkeit besser bewährt als die von Stock (1950) empfohlene Bestimmung des mittleren Tumordurchmessers am lebenden Tier, zumal die meisten subcutan überimpften festen Tumoren während der ersten 14 Tage sehr scharf umgrenzt und daher leicht und vollständig herauszupräparieren sind. Außer dem mittleren Tumorgewicht wurde zur Beurteilung der Spezifität einer etwaigen tumorhemmenden Wirkung die Veränderung des Gesamtkörpergewichts der Tiere seit der Transplantation und die Zahl der vor Versuchsende gestorbenen Tiere berücksichtigt.

Die *Ergebnisse* der Versuche sind jeweils in Form von Tabellen zusammengefaßt. Hierbei sind in Tab. 1—5, die das Ergebnis der Untersuchungen an festen Tiertumoren enthalten, die durchschnittlichen Tumorgewichte fett gedruckt, die von den Werten der betreffenden

Kontrollgruppen signifikant oder „wahrscheinlich signifikant" ($P < 0{,}05$) nach unten abweichen. Nur für solche signifikant abweichenden Werte ist in der letzten Rubrik dieser Tabellen die prozentuale Hemmung des Tumorwachstums angegeben, da es sich in den übrigen Fällen nur um eine scheinbare Wachstumshemmung handelt.

II. Feste Impftumoren

1. Untersuchungen am Sarkom 37 der Maus[1]. Der Tumor ist ein polymorphzelliges Sarkom, das auch bei heterocygoten Mäusen fast 100%ig angeht. Gelegentliche jahreszeitliche Schwankungen der Angangsrate kommen jedoch ebenso wie bei fast allen Impftumoren vor.

Versuchstechnik. Pro Versuch wurden meist 20 Tiere verwendet. Sie erhielten subcutan (unter die Rückenhaut) je 0,05 cm³ eines Tumorbreies injiziert, der von einer Maus mit einem etwa 7—10 Tage alten Sarkom stammte. 10 Tiere blieben jeweils zur Kontrolle unbehandelt, während bei den übrigen Tieren an 5 aufeinanderfolgenden Tagen — beginnend 2 Std nach der Überimpfung — das zu untersuchende Produkt einmal täglich intraperitoneal injiziert wurde. Am 10. Versuchstag (9 Tage nach der Transplantation) wurden sämtliche Tiere getötet und die herauspräparierten Tumoren gewogen. Zur Berechnung des mittleren Tumorgewichts und der durchschnittlichen Änderung des Körpergewichts (einschließlich Tumor) der Versuchs- und Kontrollgruppen wurden außer den am 10. Tag getöteten auch etwaige nach dem 8. Tag gestorbene Tiere herangezogen.

Als Beispiel für die Auswertung geben die Abb. 1 u. 2 Einzelheiten der Versuchsergebnisse bei der Prüfung eines am Sarkom 37 stark wirksamen und eines an diesem Tumor unwirksamen Produktes wieder.

Die übrigen *Versuchsergebnisse* zeigt — allerdings unter Verzicht auf Einzelheiten — die Tab. 1 (Seite 570).

Bei unseren Versuchen am Sarkom 37 erwiesen sich also *Äthylenimino-oxybuten* und *Triäthylenmelamin* als die wirksamsten Substanzen. Sie führten in verträglichen Dosen zu einer Wachstumshemmung von mehr als 80%, wobei Äthylenimino-oxybuten gegenüber TEM den Vorteil besaß, diese starke Wirkung bereits in Dosen zu entfalten, die zu keiner Herabsetzung des Körpergewichts führten. Fast ebenso stark wie diese beiden Substanzen wirkten N-Oxyd-Lost und Monomethylformamid, die das Tumorwachstum in verträglichen Dosen um 80 bzw. 77% hemmten. Weniger stark war die Wirkung von Äthylurethan, Formamid

[1] Das Sarkom 37 wurde uns liebenswürdigerweise vom Paul-Ehrlich-Institut Frankfurt/M. (Prof. Prigge u. Dr. Dittmar) — allerdings unter der Bezeichnung „Sarkom 180" — zur Verfügung gestellt (s. Fußnote bei Oettel u. Wilhelm, 1954). Wie Nachforschungen ergaben, handelt es sich jedoch bei diesem Tumor um das Mäusesarkom 37. Das „echte" Crockersarkom 180 stellte uns das Sloan-Kettering-Institut New York (Dr. Stock) zur Verfügung. Beide Tumoren werden in unserem Institut seit 4 bzw. 2 Jahren kontinuierlich gezüchtet. Über vergleichende Untersuchungen beider Sarkome hinsichtlich ihrer histologischen Struktur, Wachstumsgeschwindigkeit, Beeinflussung des Körpergewichts und Überlebenszeit wird an anderer Stelle berichtet.

und Butadiendioxyd, während für die beiden Colchicine, Myleran, 6-Mercaptopurin, Actinomycin C, N-Lost und Äthyleniminobenzochinon in verträglichen Dosen keine signifikante wachstumshemmende Wirkung mehr nachgewiesen werden konnte.

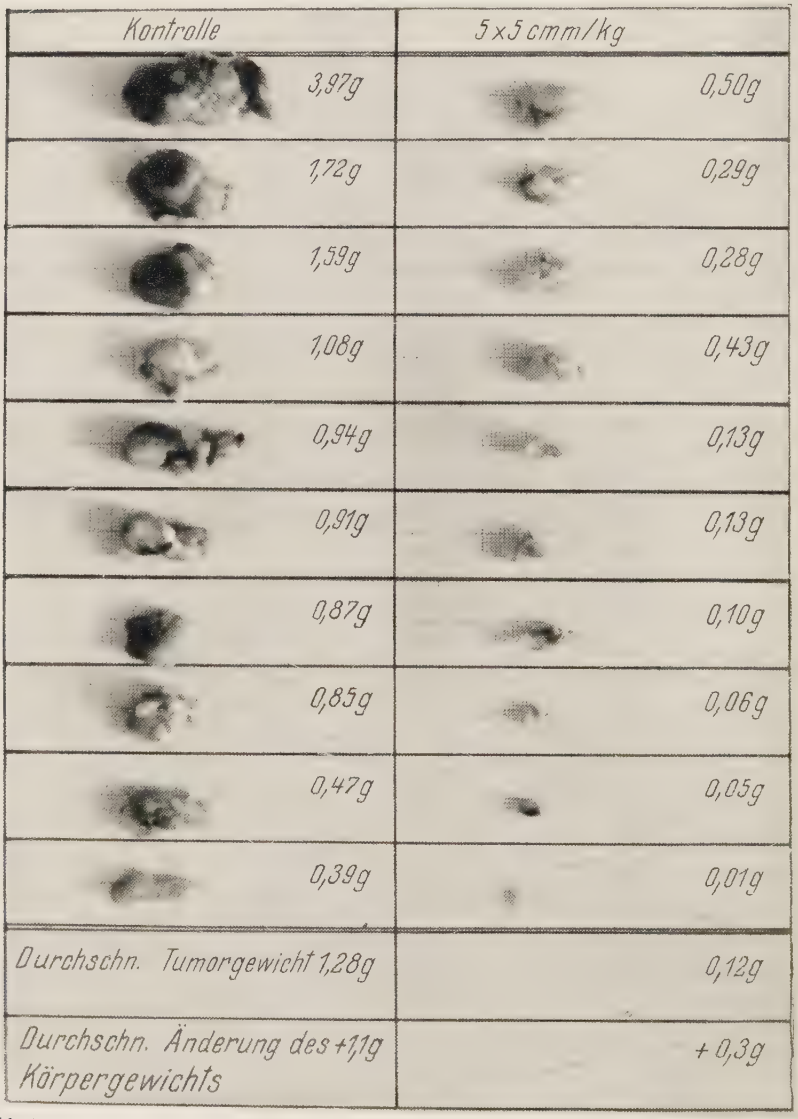


Abb. 1. *Beispiel eines am Mäusesarkom 37 stark wirksamen Produktes* (Äthylenimino-oxybuten). Links Tumoren der Kontrollgruppe, rechts Tumoren der Versuchsgruppe (je 10 Tiere). Sämtliche 20 Tiere wurden aus dem gleichen Ausgangstumor beimpft

2. Untersuchungen am Crockersarkom 180 der Maus. Ebenso wie beim Sarkom 37 handelt es sich beim Crockersarkom 180 um ein polymorphzelliges Sarkom, das fast 100 %ig angeht.

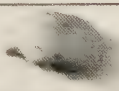
Kontrolle	5 x 20 mg/kg
 2,18	2,16
2,00	1,53
1,51	1,06
1,50	1,01
1,09	0,56
0,90	0,42
0,84	0,30
0,49	0,28
0,22	0,27
0,13	† 8. Tag 0,00
Durchschn. Tumorgewicht 1,09 (g)	0,84
Durchschn. Änderung + 1,7 des Körpergewichts (g)	− 0,5

Abb. 2. *Beispiel eines am Mäusesarkom 37 unwirksamen Produktes* (Dimethansulfonoxybutan). Links Tumoren der Kontrollgruppe, rechts Tumoren der Versuchsgruppe (je 10 Tiere). Sämtliche 20 Tiere wurden aus dem gleichen Ausgangstumor beimpft

Tabelle 1. *Untersuchungen am Sarkom 37 der Maus*

Produkt	Dosis mg/kg/ Tag	Durchschn. Tumorgewicht (g)		Duchschn. Änd. d. Körpergew. (g)		Mortalität		Hemmung d. Tumorwachstums %
		Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle	
Colchicin	0,25	1,57	1,42	+ 3,5	+ 2,6	0/10	0/10	—
	0,1	0,61	0,50	+ 2,1	+ 2,0	0/10	0/10	—
Desacetyl-methylcolchicin	3	1,38	1,31	+ 1,4	+ 1,5	2/10	0/10	—
	1	0,76	1,01	+ 0,1	+ 2,1	1/10	0/10	—
Urethan	500	**0,51**	1,20	— 1,2	+ 1,2	1/20	2/20	57
	250	**0,45**	0,85	+ 2,0	+ 3,5	0/10	0/10	47
Formamid	500	**0,06**	1,07	— 7,3	+ 1,3	8/10	0/10	*
	250	**0,44**	1,21	— 1,0	+ 2,6	0/10	0/10	64
Methyl-formamid	500	**0,01**	0,81	— 6,7	+ 2,0	6/10	0/10	*
	250	**0,24**	1,04	— 1,1	+ 2,3	0/10	0/10	77
	100	1,04	1,45	+ 0,7	+ 1,3	0/10	0/10	—
Butadien-dioxyd	20	**0,90**	2,93	+ 0,2	+ 2,5	1/10	0/10	69
	10	**0,32**	0,64	+ 0,9	+ 2,1	0/10	0/10	50
	5	0,71	0,83	+ 1,4	+ 0,5	0/10	0/10	—
Dimethan-sulfonoxy-butan	40	**0,02**	1,08	— 6,3	+ 3,8	8/10	0/10	*
	20	0,84	1,09	— 0,5	+ 1,7	1/10	0/10	—
	10	0,83	0,83	+ 1,9	+ 1,5	0/5	0/5	—
Mercaptopurin	100	**0,27**	0,95	— 2,0	+ 1,9	5/19	0/19	72
	50	0,65	0,71	+ 1,2	+ 1,5	0/10	0/10	—
	25	0,94	1,03	+ 0,7	+ 2,5	1/10	0/10	—
Actinomycin C	0,025	1,57	1,63	+ 0,8	+ 2,5	0/10	0/10	—
N-Lost	0,5	0,93	0,97	— 2,4	+ 0,4	4/10	1/10	—
	0,25	1,19	1,23	+ 1,0	+ 2,4	0/10	1/10	—
N-Oxyd-Lost	50	**0,23**	0,99	— 0,7	+ 2,0	2/10	0/10	77
	25	**0,25**	1,23	— 0,1	+ 1,8	0/20	0/20	80
TEM	1	**0,14**	1,25	— 1,3	+ 1,5	0/10	0/10	89
	0,5	**0,12**	1,07	— 1,4	+ 2,6	1/10	0/10	89
	0,25	**0,32**	0,65	+ 0,7	+ 1,9	0/20	0/20	51
	0,1	0,87	1,07	+ 2,9	+ 2,9	0/10	0/10	—
Äthylenimino-benzochinon	2,5	0,56	0,93	+ 0,8	+ 0,2	0/10	0/10	—
Äthylenimino-oxybuten	7,5	**0,03**	1,03	— 2,6	+ 2,6	4/20	0/20	97
	5,0	**0,20**	1,28	+ 0,3	+ 1,1	0/10	0/10	84
	2,5	**0,39**	1,16	+ 0,1	+ 1,9	2/30	1/30	66

* = stark toxische Dosis (Mehrzahl der Tiere vorzeitig gestorben). Eine Berechnung des Grades der Tumorhemmung ist daher sinnlos.

Versuchs- und Auswertungstechnik entsprachen der beim Sarkom 37. Die *Versuchsergebnisse* sind in Tab. 2 enthalten.

Tabelle 2. *Untersuchungen am Crockersarkom 180 der Maus*

Produkt	Dosis mg/kg/ Tag	Durchschn. Tumor-gewicht (g)		Durchschn. Änd. d. Körpergew. (g)		Mortalität		Hemmung d. Tumor-wachstums %
		Ver-such	Kon-trolle	Ver-such	Kon-trolle	Ver-such	Kon-trolle	
Colchicin	0,25	1,25	1,44	+ 1,1	+ 2,8	0/10	0/10	—
Desacetyl-methylcolchicin	3,0	**1,07**	2,56	— 1,0	— 0,5	4/10	0/10	58
	2,0	1,02	1,28	— 0,3	+ 0,9	0/10	0/10	—
Urethan	500	**0,37**	1,30	— 1,9	+ 0,4	1/10	0/10	72
	250	1,41	1,97	— 1,8	+ 1,1	0/10	0/10	—
Formamid	250	**0,85**	1,44	— 1,9	+ 0,5	1/20	0/20	41
Methyl-formamid	250	**0,03**	1,15	— 1,8	— 0,7	1/10	0/10	97
	100	1,12	1,48	— 2,2	— 0,6	0/10	0/10	—
Butadien-dioxyd	20	**0,71**	1,44	— 0,2	± 0,0	0/10	0/10	51
	10	1,82	1,62	+ 0,9	+ 0,9	0/10	0/10	—
Dimethansulfon-oxybutan	20	**0,93**	1,89	+ 0,2	+ 0,4	0/10	0/10	51
	10	**0,96**	1,69	+ 0,3	— 0,2	0/10	0/10	43
Mercapto-purin	50	**0,00**	1,02	± 0,0	+ 1,6	1/10	1/10	100
	25	**0,44**	1,64	+ 2,6	+ 0,5	0/10	0/10	73
	10	**0,81**	1,94	— 0,4	— 1,9	0/10	0/10	58
Actinomycin C	0,025	1,55	1,56	± 0,0	— 0,4	0/10	0/10	—
N-Lost	0,25	1,16	1,41	— 2,6	— 0,3	0/10	0/10	—
N-Oxyd-Lost	50	**0,04**	1,41	— 3,1	— 0,1	3/10	0/10	97
	25	**0,72**	1,94	— 0,7	— 0,3	0/10	0/10	63
TEM	1,0	**0,06**	1,54	— 1,5	+ 0,5	0/10	0/10	96
	0,5	**0,95**	2,33	— 0,1	— 0,4	0/10	0/10	59
Äthylenimino-benzochinon	2,5	1,03	1,02	0,4	- 0,6	2,20	1 20	
Äthylenimino-oxybuten	7,5	**0,03**	1,35	1,8	2,2	0 10	0,10	98
	5,0	**0,30**	1,78	1,2	0,7	0/10	0/10	83
	2,5	**0,20**	1,02	+ 0,8	+ 0,1	1/10	0/10	80

Eindeutig die beste Wirkung besaß bei unseren Versuchen am Crockersarkom 180 also *Mercaptopurin*, das in der sehr gut verträglichen Dosis von 50 mg/kg Tag zu einer 100%igen und noch in einem Fünftel dieser Dosis zu einer 58%igen Hemmung des Tumorwachstums führte. Als fast ebenso gut erwies sich Äthylenimino-oxybuten: Es führte zwar in der das Tumorwachstum fast 100%ig hemmenden Dosis von 7,5 mg/kg/Tag zu einer Gewichtsabnahme der Versuchstiere um durch-

schnittlich 1.8 g; in den sehr gut verträglichen Dosen von 5 bzw. 2,5 mg/kg/Tag hemmte es jedoch das Tumorwachstum noch um 83 bzw. 80 %, besitzt also eine große Wirkungsbreite.

TEM und Monomethylformamid hemmten ebenso wie Äthyleniminooxybuten in Dosen, die das Körpergewicht der Tiere bereits herabsetzten, das Tumorwachstum um fast 100 %. In gut verträglichen Dosen erwies sich jedoch TEM — ebenso wie am Sarkom 37 — gegenüber Äthylenimino-oxybuten als weniger wirksam, Monomethylformamid sogar als unwirksam. Eine mittlere Wirksamkeit besaßen in verträglichen Dosen N-Oxyd-Lost, Myleran, Butadiendioxyd, Äthylurethan und Formamid. Sie hemmten in verträglichen Dosen das Tumorwachstum um weniger als 75 %. Für die beiden Colchicine, Actinomycin C, Äthyleniminobenzochinon und N-Lost konnte in ungiftigen Dosen keine signifikante wachstumshemmende Wirkung nachgewiesen werden.

3. Untersuchungen am Walker-Carcinosarkom 256 der Ratte[1]. Das Walker-Carcinosarkom 256 wurde vor allem durch die ausgedehnten Untersuchungen der Arbeitsgruppe Walpole, Hendry, Rose und Homer (Imperial Chemical Industries) bekannt, an deren Versuchstechnik wir uns bei unseren eigenen Versuchen weitgehend hielten. Der Tumor besitzt bei unseren Tieren eine Angangsrate von durchschnittlich etwa 70—80 %.

Versuchstechnik. Pro Versuch, d. h. zur Prüfung einer Dosis des betreffenden Produktes, wurden im allgemeinen 20 Tiere verwendet. Sie erhielten subcutan (unter die linke Flanke) je 0,5 cm^3 eines Tumorbreies injiziert, der von einem Tier mit etwa 8—12 Tage altem Walker-Tumor stammte. 10 Tiere blieben zur Kontrolle unbehandelt, während bei den übrigen an 10 aufeinanderfolgenden Tagen — beginnend 24 Std nach der Überimpfung — das zu untersuchende Produkt einmal täglich intraperioneal injiziert wurde. Am 14. Versuchstag wurden sämtliche Tiere getötet und die herauspräparierten Tumoren gewogen.

Bei der *Auswertung* der Versuche zogen wir ebenso wie Walpole zur Berechnung des mittleren Tumorgewichts nur die 5 größten Tumoren jeder Serie heran (also 50 % der Tiere), um mit Sicherheit die gegen den Walker-Tumor resistenten oder wenig empfindlichen Tiere auszuscheiden, also mit einem gleichmäßigen, für die Versuche geeigneten Tiermaterial zu arbeiten und so bei der Berechnung der Signifikanz einer Wirkung eine möglichst geringe Streuung zu erhalten. Vor dem 12. Tag gestorbene Tiere wurden jeweils zu der nicht auszuwertenden Hälfte der Gruppe gerechnet. Wie bei den Mäusesarkomen wurde außerdem zur Beurteilung die durchschnittliche Änderung des Körpergewichts seit der Transplantation und die Zahl der vorzeitig gestorbenen Tiere in Kontroll- und Versuchsgruppe herangezogen.

Als Beispiele für die Auswertung geben die Abb. 3 u. 4 Einzelheiten der Versuchsergebnisse bei der Prüfung eines am Walker-Tumor stark wirksamen und eines an diesem Tumor unwirksamen Produktes wieder.

[1] Die Stämme verdanken wir Herrn Prof. Dr. Hoepke (Heidelberg) und Herrn Prof. Dr. Prigge bzw. Dr. Dittmar (Frankfurt/M.). Sie werden in unserem Institut seit etwa 4 Jahren kontinuierlich gehalten.

Die übrigen *Versuchsergebnisse* zeigt — unter Verzicht auf Einzelheiten — die Tab. 3.

Tabelle 3. *Untersuchungen am Walker-Tumor 256 der Ratte*

Produkt	Dosis mg/kg/ Tag	Durchschn. Tumorgewicht (g)		Durchschn.Änd. d. Körpergew. (g)		Mortalität		Hemmung d. Tumorwachstums %
		Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle	
Colchicin	0,25	21,1	19,7	+ 16,2	+ 22,3	1/10	0/10	—
Desacetyl-methylcolchicin	1,0	**9,1**	32,7	+ 2,0	+ 32,6	6/10	2/10	*
	0,5	31,8	39,0	+ 33,4	+ 52,2	1/10	2/10	—
Urethan	200	**0,06**	12,9	+ 1,2	+ 22,0	1/10	1/10	100
	100	**21,4**	34,6	+ 20,8	+ 30,0	0/10	0/10	38
Formamid	250	20,5	23,2	+ 26,8	+ 33,8	1/10	0/10	—
Methyl-formamid	200	**2,6**	19,9	— 10,3	+ 16,4	3/10	0/10	*
	100	31,4	35,5	+ 6,0	+ 33,4	1/10	2/10	—
Butadien-dioxyd	10	**1.1**	39,7	+ 9,0	+ 47,0	0/10	2/10	97
	5	30,2	45,0	+ 40,2	+ 48,4	0/10	2/10	-
Dimethansulfon-oxybutan	5	**16,3**	31,2	+ 26,7	+ 38,6	5/20	0/20	48
	4	**29,5**	46,5	+ 37,2	+ 38,6	1/10	0/10	37
Mercaptopurin	50	**18,5**	37,6	+ 21,0	+ 49,4	1/10	1/10	51
Actinomycin C	0,05	**14,3**	38,4	+ 18,0	+ 36,6	0/10	2/10	63
N-Lost	0,25	**11,4**	31,1	+ 3,8	+ 21,0	2/10	1/10	63
	0,15	**3,9**	34,6	± 0,0	+ 37,8	0/10	0/10	89
N-Oxyd-Lost	10	**0,0**	33,0	— 14,6	+ 37,4	3/10	0/10	100
	5	**0,0**	45,0	— 3,6	+ 49,8	0/10	0/10	100
TEM	0,25	**0,0**	34,9	+ 17,2	+ 46,1	0/20	0/20	100
	0,1	**0,22**	13,5	+ 9,0	+ 16,0	0/10	1/10	98
	0,05	**28,7**	38,1	+ 29,0	+ 35,6	0/10	2/10	25
	0,025	34,3	34,7	+ 23,4	+ 13,0	2/10	2/10	—
Äthyleniminobenzochinon	5	**22,3**	41,7	+ 23,6	+ 48,8	1/10	0/10	47
Äthyleniminooxybuten	10	**0,0**	25,8	— 5,8	+ 30,4	0/10	1/10	100
	7,5	**0,4**	38,7	+ 9,9	+ 35,8	1/20	2/20	99
	5,0	**1,3**	32,7	+ 3,1	+ 22,5	0/20	1/20	96
	2,5	**19,8**	34,9	+ 31,6	+ 26,3	0/9	2/10	43

* = stark toxische Dosis (Mehrzahl der Tiere vorzeitig gestorben). Eine Berechnung des Grades der Tumorhemmung ist daher sinnlos.

Im Gegensatz zu den beiden Mäusesarkomen konnte der Walker-Tumor der Ratte also durch sehr gut verträgliche Dosen einer ganzen Reihe von Produkten völlig oder fast völlig in seinem Angehen gehindert werden (Äthylurethan, Butadiendioxyd, N-Oxyd-Lost, TEM,

Äthylenimino-oxybuten). Eine weniger starke, jedoch statistisch gesicherte wachstumshemmende Wirkung hatten Myleran, 6-Mercaptopurin, Actinomycin C, N-Lost und Äthyleniminobenzochinon. Völlig unwirksam waren in verträglichen Dosen lediglich die beiden Colchicine und die beiden Formamide.

4. Untersuchungen am Benzpyrensarkom der Ratte. Dieses transplantable Spindelzellensarkom wurde in unserer Tumorabteilung durch

Abb. 3. *Beispiel eines am Walkertumor stark wirksamen Produktes* (Äthylenimino-oxybuten). Links Tumoren der Kontrollgruppe, rechts Tumoren der Versuchsgruppe (je 10 Tiere). Sämtliche 20 Tiere wurden aus dem gleichen Ausgangstumor beimpft. Zur Auswertung wurden nach Walpole nur die 5 größten Tumoren jeder Gruppe verwendet

Verimpfen eines Tumors im Gewicht von 28 g gewonnen, der im Jahre 1954 bei einer Sprague-Dawley-Ratte durch einmalige subcutane Injektion von 2 mg Benzpyren/100 g Körpergewicht (in öliger Suspension) erzeugt worden war und $4^1/_2$ Monate nach der Injektion ein für die Transplantation optimales Wachstum erreicht hatte. Der Tumor ging zunächst nur bei etwa 30 %, nach mehreren Passagen jedoch bereits bei

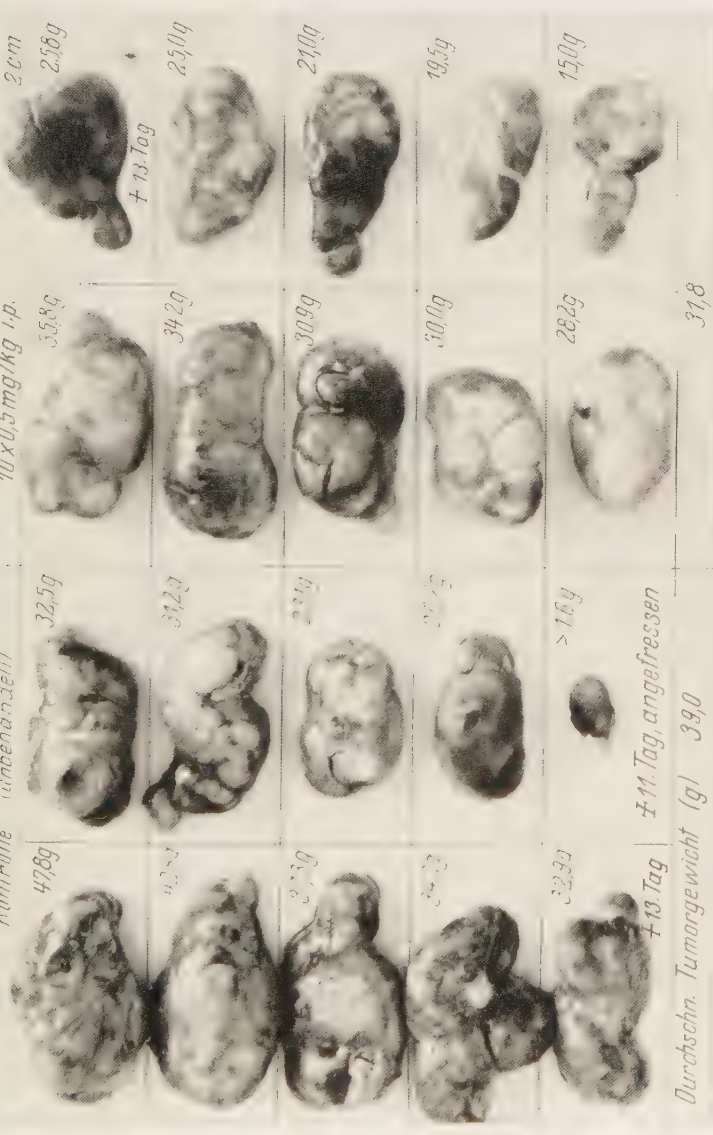


Abb. 4. *Beispiel eines am Walkertumor unwirksamen Produktes* (Desacetylmethylcolchicin). Links Tumoren der Kontrollgruppe, rechts Tumoren der Versuchsgruppe (je 10 Tiere). Sämtliche 20 Tiere wurden aus dem gleichen Ausgangstumor beimpft. Zur Auswertung wurden nach WALPOLE nur die 5 größten Tumoren jeder Gruppe verwendet

70—75% der Tiere an, und zwar ohne vorherige Behandlung der Empfängertiere mit Röntgenstrahlen oder Cortison. Er befindet sich jetzt in der 92. Passage und wird seit der 10. Passage von uns zum Testen verwendet.

Versuchstechnik und Auswertung entsprachen der beim Walker-Tumor der Ratte.

Die *Versuchsergebnisse* zeigt Tab. 4.

Tabelle 4. *Untersuchungen am Benzpyrensarkom der Ratte*

Produkt	Dosis mg/kg/Tag	Durchschn. Tumorgewicht (g)		Durchschn. Änd. d. Körpergew. (g)		Mortalität		Hemmung d. Tumorwachstums (%)
		Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle	
Colchicin	0,25	19,1	28,7	+ 7,8	+ 28,4	0/10	0/10	—
Desacetyl-methylcolchicin	0,5	29,9	42,2	+ 42,0	+ 59,0	0/10	0/10	—
Urethan	300	13,7	23,3	+ 20,4	+ 36,8	0/10	0/10	—
Formamid	250	41,8	42,7	+ 36,0	+ 53,8	0/10	0/10	—
Methyl-formamid	200	5,4	5,9	+ 8,8	+ 34,4	0/10	0/10	—
Butadien-dioxyd	20	**9,1**	44,6	— 12,8	+ 50,6	1/10	1/10	80
	10	**17,6**	45,8	+ 17,4	+ 42,8	0/10	0/10	62
Dimethansulfon-oxybutan	5	23,2	19,0	+ 27,8	+ 44,0	2/10	0/10	—
Mercaptopurin	50	47,7	56,0	+ 38,4	+ 57,6	3/10	1/10	—
Actinomycin C	0,075	**7,1**	27,2	— 6,6	+ 47,6	4/10	0/10	74
	0,05	**12,8**	32,9	+ 24,2	+ 60,8	0/10	0/10	61
N-Lost	0,25	31,9	48,9	+ 8,4	+ 49,0	0/10	1/10	—
N-Oxyd-Lost	5	13,5	24,6	+ 4,6	+ 50,4	2/10	1/10	—
TEM	0,25	31,8	22,7	+ 40,4	+ 32,6	1/10	1/10	—
Äthylenimino-benzochinon	5	27,6	32,4	+ 24,6	+ 30,8	0/10	0/10	—
Äthylenimino-oxybuten	15	**6,6**	26,7	— 3,4	+ 47,4	2/10	0/10	75
	10	**15,7**	32,9	+ 8,0	+ 41,6	1/10	0/10	52
	7,5	**28,1**	45,5	+ 26,3	+ 49,4	1/10	1/10	38

Von sämtlichen 14 Produkten zeigten nur *Äthylenimino-oxybuten*, *Butadiendioxyd* und *Actinomycin C* in verträglichen Dosen eine signifikante wachstumshemmende Wirkung (um etwa 50–60%). Selbst in bereits toxischen Dosen, die zu einem Gewichtsverlust oder zum vorzeitigen Tod von Versuchstieren führten, betrug diese Wachstumshemmung jedoch niemals mehr als 80%.

5. Untersuchungen am Methylcholanthrensarkom der Ratte. Auch dieser Tumorstamm — ebenfalls ein transplantables Spindelzellensarkom — wurde in unserer Tumorabteilung gewonnen. Er entstand durch Weitertransplantation eines 33 g schweren Sarkoms, das 1954 bei einer Sprague-Dawley-Ratte durch einmalige subcutane Injektion von 10 mg Methylcholanthren/100 g Körpergewicht (in öliger Suspension) erzeugt worden war und 4½ Monate nach der Injektion überimpft werden konnte. Die Angangsrate des Sarkoms lag anfangs bei 30—40%, nach mehreren Passagen jedoch bereits — ebenfalls ohne Vorbehandlung der Empfängertiere mit Röntgenstrahlen oder Cortison — bei 50—70%. Der Tumor befindet sich jetzt in der 86. Passage und wird seit der 10. Passage zum Testen eingesetzt.

Versuchstechnik und Auswertung entsprachen der bei den übrigen Rattentumoren.

Die *Versuchsergebnisse* zeigt Tab. 5.

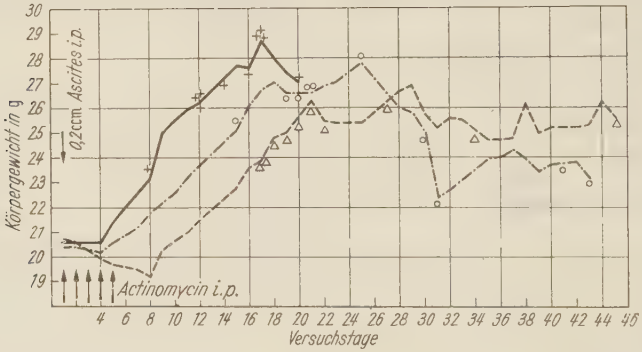
Tabelle 5. *Untersuchungen am Methylcholanthrensarkom der Ratte*

Produkt	Dosis mg/kg/ Tag	Durchschn. Tumorgewicht (g)		Durchschn. Änd. d. Körpergew. (g)		Mortalität		Hemmung d. Tumorwachstums %
		Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle	
Colchicin	0,25	14,5	25,1	+ 12,8	+ 29,8	0/10	0/10	—
Desacetyl-methylcolchicin	0,5	11,4	18,3	+ 10,1	+ 27,9	1/20	0/20	—
Urethan	500	13,0	16,4	— 13,4	+ 35,3	2/10	3/10	—
Formamid	250	25,3	22,6	+ 22,2	+ 37,0	0/10	0/10	—
Methyl-formamid	200	21,0	34,3	— 6,4	+ 25,4	0/10	0/10	—
Butadien-dioxyd	20	10,0	18,9	— 24,8	+ 28,2	2/10	0/9	47
	10	19,5	22,4	+ 24,6	+ 39,0	0/10	0/10	—
Dimethansulfon-oxybutan	5	19,5	34,1	+ 5,0	+ 28,8	4/10	0/10	43
	4	22,4	21,5	+ 22,2	+ 34,0	0/10	0/10	—
Mercaptopurin	50	12,9	16,2	+ 11,0	+ 38,8	4/10	0/10	—
Actinomycin C	0,05	9,1	15,0	+ 12,7	+ 30,9	0/20	0/20	—
N-Lost	0,25	9,8	13,4	— 10,2	+ 16,8	3/10	0/10	—
N-Oxyd-Lost	5	9,7	27,1	— 4,4	+ 43,2	1/10	0/10	64
TEM	0,25	10,7	23,9	+ 15,2	+ 25,0	0/20	0/20	55
Äthylenimino-benzochinon	5	8,2	14,0	+ 23,6	+ 33,0	0/10	0/10	—
Äthylenimino-oxybuten	10	15,7	33,7	+ 10,6	+ 30,4	0/9	0/10	53

Am Methylcholanthrentumor zeigten — ebenso wie am Benzpyrentumor — nur 3 von 14 Produkten in verträglichen Dosen eine signifikante Wirkung: *Äthylenimino-oxybuten*, *TEM* und *N-Oxyd-Lost*. Auch hier erwiesen sich jedoch wie am Benzpyrensarkom die erreichbaren Wachstumshemmungen als geringer als beim Walker-Tumor. Sie lagen für Äthylenimino-oxybuten und TEM in gut verträglichen Dosen bei 53 bzw. 55%, für N-Oxyd-Lost in einer bereits leicht toxischen Dosis bei 64%.

III. Ascitestumoren

1. Ehrlichscher Mäuseascitestumor[1]. Der Ehrlichsche Mäuseascitestumor, der in Deutschland vor allem durch die Arbeiten von Lettré (1950) bekannt wurde, geht praktisch 100%ig an. Die Tumorzellen



Kurve	Dosis (mg/kg)	Tierzahl	Durchschn. Ascitesmenge (g)	Durchschn. Lebensdauer (Tage)	gestorben
---	5×0,05	10	4,7	23,0	△
-·-	5×0,025	10	8,7	25,6	○
——	Kontrolle	10	8,4	13,5	+

Abb. 5. *Beispiel eines am Ehrlichschen Mäuseascitestumor stark wirksamen Produktes:* Herabsetzung der Ascitesmenge und Verlängerung der Lebensdauer. Sämtliche Versuchs- und Kontrolltiere wurden mit dem gleichen Tumormaterial geimpft

wachsen größtenteils frei in der Ascitesflüssigkeit, zum Teil aber auch infiltrativ in Form von festem Tumorgewebe um und in inneren Organen. Die Lebensdauer der Tumortiere beträgt bei relativ geringer Streuung im Durchschnitt 13—16 Tage.

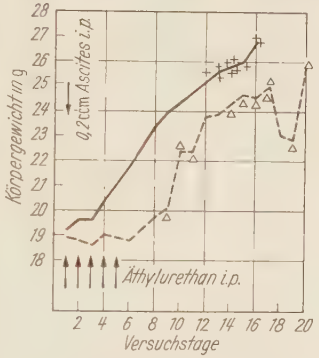
Versuchstechnik. Pro Versuch wurden meist 20—40 Mäuse verwendet. Sie wurden intraperitoneal mit je 0,2 cm³ Ascites geimpft, der von einer Maus (gelegentlich von 2 Tieren) mit etwa 7—8 Tage altem Ascitestumor stammte. 10 Tiere wurden intraperitoneal zur Kontrolle mit dem Lösungsmittel (Aqua dest. bzw. physiol. Kochsalzlösung), die übrigen mit verschiedenen Dosen des zu untersuchenden Produktes behandelt (10 Tiere pro Dosis). Die Injektionen erfolgten an 5 aufeinanderfolgenden Tagen und begannen 2 Std nach der Überimpfung. Die Tiere wurden

[1] Der Tumorstamm wurde uns liebenswürdigerweise von Herrn Prof. Dr. Lettré (Heidelberg) vor 5 Jahren zur Verfügung gestellt und wird seither bei uns gehalten.

täglich gewogen, bis zu ihrem Spontantod beobachtet und anschließend seziert. Der Ascites wurde durch Austupfen der Bauchhöhle mit Zellstoff entfernt und seine Menge durch Rückwägen der Tiere bestimmt.

Auswertung. Die Gewichtskurven der Ascitestiere, für die Abb. 5 und 6 Beispiele bringen, vermitteln zwar einen gewissen Eindruck von der Geschwindigkeit des Tumorwachstums. Sie genügen zur Beurteilung aber nicht, da das Körpergewicht der Tiere, wie Abb. 6 am Beispiel des unwirksamen Äthylurethans zeigt, nicht nur von der Ascitesmenge, sondern auch von der Toxicität der Testsubstanzen abhängt. (Trotz des niedrigeren Verlaufs der Gewichtskurve bei den mit 500 mg Äthylurethan/kg/Tag behandelten Tieren war die Ascitesmenge gegenüber der der Kontrolltiere nicht signifikant herabgesetzt!). Das im Bauchraum infiltrativ wachsende feste Tumorgewebe ist einer quantitativen Bestimmung im allgemeinen ohnehin nicht zugängig.

Die Beurteilung erfolgte daher in erster Linie auf Grund der genau zu bestimmenden *Ascitesmenge* beim Spontantod sowie auf Grund der *Überlebenszeit* der Tumortiere. Eine Hemmung der Ascitesbildung wurde nur dann angenommen, wenn bei *nicht* verkürzter Lebensdauer die Ascitesmenge der Versuchstiere signifikant gegenüber der der Kontrollen herabgesetzt war.



Kurve	Dosis (mg/kg)	Tierzahl	Durchschn. Lebensdauer in Tagen	Durchschn. Ascitesmenge in g	gestorben
– – –	5×500	10	13,8	6,0	△
——	Kontrolle	10	13,1	8,7	+

Abb. 6. *Beispiel eines am Ehrlichschen Mäuseascitestumor unwirksamen Produktes:* Keine signifikante Herabsetzung der Ascitesmenge, keine Verlängerung der Lebensdauer. Die verzögerte Gewichtszunahme der behandelten Tiere ist Ausdruck der Toxicität. Sämtliche Versuchs- und Kontrolltiere wurden mit dem gleichen Tumormaterial geimpft

Die *Versuchsergebnisse* zeigt Tab. 6 (S. 580).

Die signifikant oder „wahrscheinlich signifikant" ($P < 0{,}05$) von den Werten der betreffenden Kontrollgruppen nach oben abweichenden Werte für die mittlere Lebensdauer sowie die bei nicht verkürzter Lebensdauer signifikant oder „wahrscheinlich signifikant" nach unten abweichenden Werte für die gebildete Ascitesmenge sind in dieser Tabelle fett gedruckt.

Wie die Tabelle zeigt, konnte das *Angehen* des Mäuseascitestumors und der *Tod* als Folge der Tumorerkrankung durch *keines* der geprüften Produkte verhindert werden.

Die *Lebensdauer* der Ascitesmäuse wurde jedoch durch einige Produkte (Colchicin, N-Methylformamid, die beiden N-Lost-Präparate, TEM, Äthyleniminobenzochinon und Actinomycin C) signifikant verlängert. Am wirksamsten war in dieser Hinsicht *Colchicin*: Während sämtliche Kontrolltiere 18 Tage nach der Überimpfung gestorben waren, lebten alle mit 0,5 mg Colchicin/kg/Tag behandelten Mäuse länger als 21 Tage, ein Tier sogar 55 Tage lang!

Tabelle 6. *Untersuchungen am Ehrlichschen Mäuseascitestumor* (Bei der Prüfung jedes einzelnen Produktes wurden alle Versuchs- und Kontrolltiere mit dem gleichen Tumormaterial geimpft)

Produkt	Dosis mg/kg/ Tag	Lebensdauer (Tage)			Ascitesmenge beim Tod (g)	Zahl d. Tiere mit festen Bauchdeckentumoren
		Mittelwert	Mittl. Abweichung (σ)	Variationsbreite (absol. Streuung, „range“)		
Colchicin	Kontr.	14,0	± 3,5	5—18	8,3	0/10
	0,5	**31,7**	± 10,7	22—55	**3,1**	5/10
	0,25	**19,5**	± 6,2	8—31	**4,1**	5/10
	0,1	14,4	± 5,5	2—20	5,3	2/10
Desacetyl-methylcolchicin	Kontr.	14,4	± 1,6	12—17	11,3	0/8
	3	13,8	± 3,2	8—18	9,9	0/8
	2	14,8	± 1,9	12—18	9,3	0/8
Urethan	Kontr.	13,1	± 1,3	11—15	8,7	0/10
	500	13,8	± 3,8	8—19	6,0	0/10
Formamid	Kontr.	15,3	± 1,9	13—18	9,0	0/10
	400	11,7	± 5,0	6—19	2,0	0/10
	200	12,7	± 3,5	7—18	3,0	0/10
	100	15,2	± 2,2	11—18	**5,3**	0/10
Methylformamid	Kontr.	14,1	± 3,5	9—20	8,8	0/9
	250	**18,9**	± 5,0	7—23	**5,7**	0/10
	100	**18,1**	± 4,1	13—25	6,4	0/10
	50	15,1	± 3,6	10—20	9,2	0/9
Butadiendioxyd	Kontr.	15,1	± 3,8	10—23	6,5	0/10
	30	6,7	± 4,9	1—18	0,8	0/10
	20	16,9	± 5,3	7—23	8,7	0/10
Dimethansulfon-oxybutan	Kontr.	13,0	± 2,4	9—17	7,1	0/10
	20	11,3	± 1,6	8—13	6,6	0/10
	10	11,7	± 2,9	5—15	5,3	0/10
Mercaptopurin	Kontr.	11,6	± 2,5	6—14	6,7	0/10
	50	12,5	± 3,8	7—19	4,8	0/10
	25	12,2	± 2,5	9—16	5,4	0/10
	10	12,1	± 1,8	9—15	6,8	0/10
Actinomycin C	Kontr.	13,5	± 3,6	7—19	8,4	0/10
	0,05	**23,0**	± 9,1	16—44	**4,7**	4/10
	0,025	**25,6**	± 9,5	14—42	**8,4**	7/10
N-Lost	Kontr.	11,2	± 3,3	5—16	3,9	0/10
	0,5	**19,1**	± 10,3	7—36	2,8	4/10
	0,25	13,6	± 4,6	8—21	3,7	0/10
N-Oxyd-Lost	Kontr.	14,9	± 2,7	10—20	10,5	0/10
	50	13,4	± 8,0	5—27	**0,5**	0/10
	25	**18,9**	± 5,0	10—25	**4,3**	0/10
	10	14,6	± 3,0	8—19	8,6	0/10

Tabelle 6 (Fortsetzung)

Produkt	Dosis mg/kg/ Tag	Lebensdauer (Tage)			Ascitesmenge beim Tod (g)	Zahl d. Tiere mit festen Bauchdeckentumoren
		Mittelwerte	Mittl. Abweichung (σ)	Variationsbreite (absol. Streuung, „range“)		
TEM	Kontr.	13,1	± 1,8	11—16	9,3	0/10
	1	**25,3**	± 9,3	13—43	**2,7**	7/10
	0,5	17,5	± 4,8	6—23	**5,6**	1/10
Äthylenimino-benzochinon	Kontr.	14,0	± 4,3	7—22	6,8	0/10
	10	11,8	± 3,6	7—18	**0,5**	0/10
	5	**24,9**	± 16,1	8—56	**3,1**	5/10
	2,5	18,6	± 8,7	6—39	3,7	0/10
Äthylenimino-oxybuten	Kontr.	12,9	± 2,8	8—16	8,8	0/10
	7,5	14,1	± 2,5	11—18	**3,5**	0/10
	5,0	13,2	± 4,6	7—21	7,4	0/10
	2,5	14,1	± 2,6	10—18	9,9	0/10

Alle am Mäuseascitestumor lebensverlängernden Produkte (mit Ausnahme von N-Lost) setzten gleichzeitig die *Ascitesbildung* eindeutig herab. Damit verbunden war regelmäßig eine eigenartige Veränderung des Tumorcharakters: Aus der häufig auch bei unbehandelten Ascitesmäusen an der Injektionsstelle zu beobachtenden linsengroßen Verhärtung aus festem Tumorgewebe wuchsen bei behandelten und länger als etwa 25 Tage lebenden Tieren große *solide Bauchdeckentumoren* im Gewicht bis zu 8 g heran. Aus einem primär vorwiegend in Ascitesform wachsenden Tumor mit der charakteristischen, relativ kurzen und individuell wenig schwankenden Lebensdauer war also ein vorwiegend *fester* Tumor geworden, der interessanterweise auch andere Eigenschaften der primär in fester Form wachsenden Impftumoren — wie z. B. die relativ lange und individuell sehr stark schwankende Lebensdauer der Versuchstiere — angenommen hatte.

Tab. 6 enthält zahlreiche Beispiele für diese Beobachtung: So betrug z. B. bei dem Versuch mit TEM die mittlere Lebensdauer der Kontrolltiere 13,1 Tage bei einer absoluten Streuung (Variationsbreite = range) von 11—16 Tagen und einer mittleren Abweichung (σ) von nur ± 1,8 Tagen. Nach Behandlung mit 5 × 1 mg/kg TEM entstanden im Gegensatz zur Kontrollgruppe bei 7 von 10 Tieren feste Bauchdeckentumoren bei gleichzeitiger signifikanter Abnahme der Ascitesbildung. Die Variationsbreite der stark verlängerten Lebensdauer stieg dabei auf 13—43, die mittlere Abweichung auf ± 9,3 Tage an!

Neben den die Lebensdauer der Ascitestiere verlängernden und meist gleichzeitig die Ascitesbildung herabsetzenden Produkten verringerten

andere (Formamid und Äthylenimino-oxybuten) bei unbeeinflußter Lebensdauer lediglich die Ascitesbildung signifikant.

Weitere Substanzen (Desacetylmethylcolchicin, Urethan, Butadiendioxyd, Myleran und Mercaptopurin) beeinflußten weder die Lebensdauer noch die Ascitesmenge, waren also völlig unwirksam.

2. **Yoshida-Ascitessarkom der Ratte**[1]. Der in Japan bereits seit mehreren Jahren in ausgedehntem Maße (Yoshida), in Deutschland dagegen erst neuerdings (Lettré 1953, Druckrey 1954 und 1955) in der Krebsforschung verwendete Impftumor geht bei unseren Sprague-Dawley-Ratten 90—100%ig an. Ebenso wie beim Mäuseascitestumor wachsen die Tumorzellen größtenteils frei in der sich rasch bildenden Ascitesflüssigkeit, zum Teil aber auch infiltrativ um und in inneren Organen. Die Lebensdauer der Tumortiere beträgt bei unserem Stamm im Durchschnitt 8—14 Tage. Im Gegensatz zu den Verhältnissen am Mäuseascitestumor kommt es jedoch beim Yoshida-Tumor gelegentlich vor, daß Einzeltiere — auch ohne Behandlung mit Cytostatica! — mehrere Wochen lang unter Ausbildung fester Bauchdeckentumoren am Leben bleiben.

Versuchstechnik. Pro Versuch wurden jeweils 20 Tiere verwendet. Sie wurden intraperitoneal mit je 0,5 cm^3 Ascites geimpft, der von einem Tier mit etwa 6 bis 7 Tage altem Yoshida-Tumor stammte. 10 Tiere wurden intraperitoneal zur Kontrolle mit dem Lösungsmittel (Aqua dest. oder physiol. Kochsalzlösung), die übrigen mit dem zu untersuchenden Produkt behandelt. Die Injektionen erfolgten an 5 aufeinanderfolgenden Tagen und begannen 2 Std nach der Überimpfung. Die überlebenden Tiere wurden nach 100 Tagen getötet und ebenso wie die spontan gestorbenen Ratten seziert. Der Ascites wurde durch Austupfen der Bauchhöhle mit Zellstoff entfernt und seine Menge durch Rückwägen der Tiere bestimmt.

Auswertung. Anders als beim Mäuseascitestumor gibt die *Gewichts-Kurve* der Yoshida-Ratten keinen Eindruck von der Art des Tumorwachstums, da die absolute *Ascitesmenge* der Ratten nicht wesentlich über der der Mäuse liegt, im Verhältnis zu dem etwa 5mal größeren Gesamtkörpergewicht also kaum ins Gewicht fällt.

Da am Yoshida-Tumor bei stark wirksamen Produkten die *Lebensdauer* der Tumortiere oft länger als die 100tägige Beobachtungszeit ist, haben wir uns in solchen Fällen wie andere Autoren (Druckrey 1954, Stock 1955) auf die Fixation der *Absterbekurven* beschränkt (s. Abb. 7) und die durchschnittliche Lebensdauer nur bei solchen Produkten angegeben, die die Lebensdauer nicht verlängern (s. Tab. 7). In jedem Falle wurde darüberhinaus die durchschnittliche *Ascitesmenge* beim Tod bestimmt. Die signifikant oder „wahrscheinlich signifikant" ($P < 0{,}05$) von den Werten der betreffenden Kontrollgruppen nach unten abweichenden Werte für die durchschnittliche Ascitesmenge sind in Abb. 7 und Tab. 7 jeweils fett gedruckt.

Ergebnisse. Im Gegensatz zum Mäuseascitestumor gelang es beim Yoshida-Tumor der Ratte mit mehreren Substanzen, ein *Angehen* des Tumors bei einem Teil oder sogar bei allen behandelten Tieren zu

[1] Der Stamm wurde uns liebenswürdigerweise von Prof. Schubert und Dr. Uhlmann (Hamburg) zur Verfügung gestellt. Er wird seit $1^1/_2$ Jahren in unserem Institut kontinuierlich weitergezüchtet.

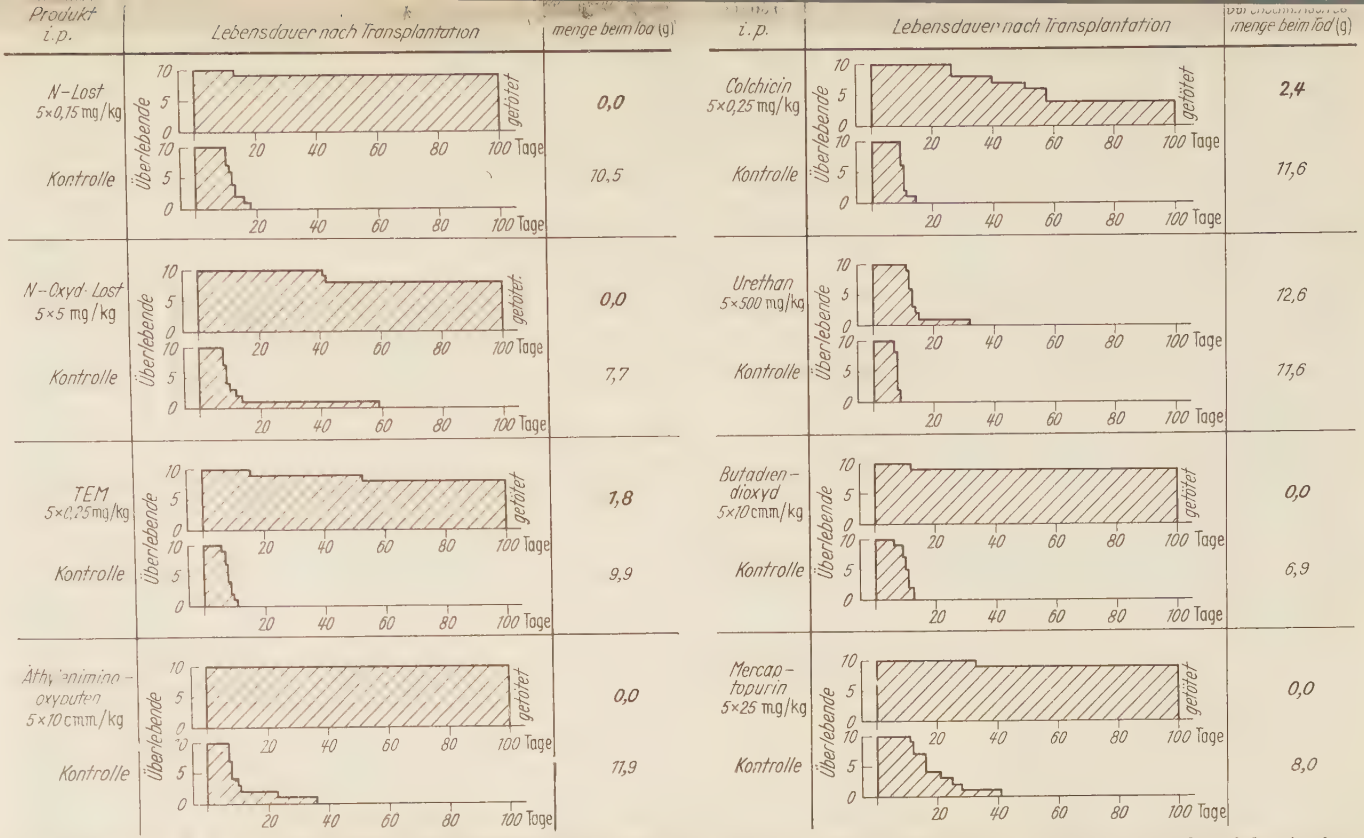


Abb. 7. *Beispiele für die mehr oder weniger starke Wirksamkeit verschiedener Cytostatica am Yoshida-Ascitessarkom der Ratte.* Bei der Prüfung jedes einzelnen Cytostaticums wurden alle Kontroll- und Versuchstiere aus dem gleichen Ausgangstumor beimpft. Unten jeweils Absterbekurven von 10 mit dem Lösungsmittel behandelten Kontrollratten, oben jeweilige Absterbekurven von 10 Versuchstieren bei 5maliger Injektion eines Cytostaticums. Beobachtungszeit: 100 Tage. Nur in der mit Äthylenimino-oxybuten behandelten Gruppe überleben alle 10 Versuchsratten

verhindern, die *Tiere also völlig zu „heilen"*. Am besten von allen Produkten wirkte in dieser Hinsicht *Äthylenimino-oxybuten*: Nach Behandlung mit diesem Produkt blieben alle 10 Versuchstiere am Leben und zeigten weder Ascitesbildung noch festes Tumorgewebe. Eine fast ebenso gute Wirkung hatten N-Lost, N-Oxyd-Lost, Butadiendioxyd und 6-Mercaptopurin: In den Versuchen mit diesen Produkten starben allerdings jeweils 1 oder 2 der behandelten Tiere vor Ablauf der 100tägigen Beobachtungsperiode — bei 6-Mercaptopurin, N-Lost, N-Oxyd-Lost und Butadiendioxyd ohne, bei TEM mit Ascites und festem Tumorgewebe. Alle übrigen Tiere erwiesen sich als geheilt.

Tabelle 7. *Untersuchungen am Yoshida-Ascites-sarkom der Ratte.* Produkte, die die Lebensdauer nicht signifikant verlängern

Produkt	Dosis mg/kg/ Tag	Durchschn. Lebensdauer (Tage)	Durchschn. Ascitesmenge beim Tod (g)
Desacetylmethylcolchicin	0,5	10,0	9,1
	Kontr.	10,2	9,4
Formamid	250	9,6	4,5
	Kontr.	10,4	6,1
N-Methylformamid	200	8,6	**3,0**
	Kontr.	8,9	8,2
Dimethansulfonoxybutan	4	10,1	7,7
	Kontr.	8,7	11,8
Actinomycin	0,05	17,1	**3,4**
	Kontr.	12,0	8,6
Äthylenimino-Benzochinon	2,5	7,9	**3,2**
	Kontr.	8,7	6,8

Eine gewisse Sonderstellung nimmt *Colchicin* ein, das die Lebensdauer der Tiere ebenfalls sehr stark verlängerte, das Angehen des Tumors aber nur bei 4 von 10 Tieren verhindern konnte und bei 4 weiteren Tieren, ähnlich wie beim Mäuseascitestumor, zur Entstehung großer Bauchdeckentumoren im Gewicht bis zu 53 g führte.

Urethan verlängerte die Lebensdauer der behandelten Tiere zwar signifikant, jedoch nur um wenige Tage, hatte aber keinen Einfluß auf die Ascitesbildung. Actinomycin C, N-Methylformamid und Äthyleniminobenzochinon[1] setzten umgekehrt nur die Ascitesbildung herab, während sie die Lebensdauer nicht verlängerten. Desacetylmethylcolchicin, Formamid und Myleran hatten weder auf die Ascitesbildung noch auf die Lebensdauer der behandelten Tiere irgendeinen Einfluß.

IV. Tumor-Spektrum

Tab. 8, die als Grundlage zur folgenden Diskussion dienen soll, gibt einen *Überblick* über unsere in den vorangehenden Abschnitten im einzelnen aufgeführten Versuchsergebnisse und Tabellen.

Die Wirkung der einzelnen Substanzen wurde in der Weise gewertet, daß die mit ganz verschiedener Methodik gewonnenen Versuchsergebnisse

[1] Äthyleniminobenzochinon wurde am Yoshida-Tumor im Gegensatz zu den anderen Rattentumoren in Dosen von 4 oder 5 mg/kg/Tag nicht vertragen und mußte daher niedriger dosiert werden!

an festen Tumoren einerseits und an Ascitestumoren andererseits in gleicher Weise zu erfassen waren. Es wurde lediglich zwischen unwirksamen (—), mäßig wirksamen (+) und stark wirksamen (++) Substanzen unterschieden auf Grund der folgenden Kriterien:

Als *unwirksam* wurden an festen und Ascitestumoren sämtliche Substanzen bezeichnet, die keine ($P < 0{,}05$) oder erst in toxischen Dosen eine signifikante Wirkung besaßen. Unter „toxischen Dosen" wurden hierbei Dosen verstanden, die entweder in der Versuchsgruppe über 10% mehr Tiere töteten als in der betreffenden Kontrollgruppe spontan starben[1] oder die das Gesamtkörpergewicht der Tiere (einschließlich Tumor) um mehr als 10% herabsetzten (> 2 g/Maus bzw. > 10 g/Ratte).

Tabelle 8. *Tumorspektrum der geprüften 14 Cytostatica*

Produkte	Ergebnisse						
	Feste Tumoren					Ascitestumoren	
	Sarkom 37 (Maus)	Sarkom 180 (Maus)	Walker (Ratte)	Benzpyren (Ratte)	Methylchol. (Ratte)	Ehrlich (Maus)	Yoshida (Ratte)
Colchicin	—	—	—	—	—	++	++
Desacetylinäthylcolchicin	—	·	—	·		·	·
Aethylurethan	+	+	++	—	—	—	+
Formamid	+	+	—	—	—	+	—
Methylformamid	++	++	—	—	—	++	+
Butadiendioxyd	+	+	++	+	—	—	++
Dimethansulfonoxybutan	—	+	+	—	—	—	—
Mercaptopurin	—	++	+	—	—	—	++
Actinomycin C	—	—	+	+	—	++	+
N-Lost	—	—	++	—	—	+	++
N-Oxyd-Lost	++	+	++	—	+	++	++
TEM	++	++	++	—	+	++	++
Äthyleniminobenzochinon	—	—	+	—	—	++	+
Äthylenimino-oxybuten	++	++	++	+	+	+	++

Zeichenerklärung: — = unwirksam, + = mäßig wirksam, ++ = stark wirksam

Als *mäßig wirksam* wurden bei Untersuchungen an *festen* Tumoren Substanzen bezeichnet, die in verträglichen Dosen zu einer signifikanten Wachstumshemmung von weniger als 75% führten. An Ascitestumoren wurde das gleiche Prädikat solchen Produkten erteilt, die entweder *nur* zu einer Hemmung der Ascitesbildung oder aber *nur* zu einer Verlängerung der Lebensdauer führten.

Als *stark wirksam* bezeichneten wir Substanzen, die in verträglichen Dosen an festen Tumoren das Tumorwachstum um mehr als 75% hemmten oder an Ascitestumoren sowohl zu einer signifikanten Hemmung der

[1] Der Tod eines von 10 Tieren einer Gruppe (= 10%) muß nicht Folge der toxischen Wirkung des untersuchten Produktes, sondern kann auch Folge der Tumorerkrankung des betreffenden Tieres sein.

Ascitesbildung als auch zu einer signifikanten Verlängerung der Lebensdauer führten.

Die in Tab. 8 dargestellten Ergebnisse unserer Versuche lassen sich unter Verzicht auf Einzelheiten nochmals nach zwei Gesichtspunkten zusammenfassen und in Form zweier Abbildungen darstellen: Aus Abb. 8 geht die Empfindlichkeit der einzelnen Tiertumoren gegenüber den von uns geprüften Cystotatica hervor, Abb. 9 zeigt die Wirkungsbreite der einzelnen Cytostatica an verschiedenen Tiertumoren. Beide Abbildungen beantworten also in kürzester Form die beiden zu Beginn unserer Arbeit aufgeworfenen Fragen, auf die in der Diskussion näher eingegangen werden muß.

Diskussion

A. Empfindlichkeit der einzelnen Tiertumoren gegen Cytostatica (s. Abb. 8).

Am leichtesten von den zur Testung verwendeten Tiertumoren waren der *Yoshida-Tumor und der Walkertumor der Ratte* zu beeinflussen, und zwar nicht nur hinsichtlich der Zahl der an diesen beiden Testobjekten wirksamen Produkte (am Yoshida-Tumor 11 von 14, am Walker-Tumor 10 von 14 Produkten) sondern auch hinsichtlich der Stärke der erreichbaren Wachstumshemmung: Der Yoshida- und der Walker-Tumor waren die einzigen Impftumoren, bei denen in unseren Untersuchungen *mehrere* Substanzen in gut verträglichen Dosen eine 100%ige *Wachstumshemmung* bewirkten, ein Angehen des Tumors also völlig verhinderten.

Ob es sich hierbei um *Dauerheilungen* handelt, kann auf Grund unserer bisherigen Versuche nicht mit Sicherheit gesagt werden. Beim *Yoshida-Tumor* erscheint eine solche Annahme aber in Anbetracht des relativ langen Beobachtungszeitraumes von über einem Vierteljahr vorläufig gerechtfertigt. Wir können uns also der Auffassung Druckreys (1954 und 1955), daß es sich bei der Prüfung eines Produktes am Yoshida-Tumor um einen sehr strengen Test handle, da der Tumor *besonders bösartig* sei, *nicht* anschließen, sondern müssen diesen Tumor im Gegenteil auf Grund unserer Erfahrungen ebenso wie Stock (1955) als chemotherapeutisch *besonders leicht beeinflußbar* bezeichnen.

Beim *Walker-Tumor*, bei dem der Beobachtungszeitraum im Screeningtest nur 14 Tage betrug, ist dagegen eine Dauerheilung durch irgendwelche Produkte, selbst wenn sie das Angehen der Tumoren zunächst völlig verhindern, sehr unwahrscheinlich. Auf Grund eigener Versuche wissen wir, daß Walker-Tumoren, die bei Behandlung mit stark wirksamen Produkten zunächst überhaupt nicht angegangen waren, längere Zeit (3—4 Wochen) nach Absetzen der Therapie doch noch zu wachsen beginnen können. Sie erweisen sich dann gegenüber einer erneuten Behandlung mit den gleichen Produkten meist als *resistent*, was für TEM bereits früher von Jackson gezeigt wurde.

Nur wenig kleiner als die Zahl der am Yoshida- und am Walker-Tumor wachstumshemmenden Produkte war die der am *Crockersarkom 180* wirksamen Substanzen (9 von 14). Die erreichbaren Wachstumshemmungen erwiesen sich an diesem Testobjekt jedoch als wesentlich geringer: Eine 100%ige Tumorhemmung wurde in Dosen, die das Körpergewicht der Tiere nicht herabsetzten, nur durch eine einzige Substanz (6-Mercaptopurin) erreicht.

Die gleiche Empfindlichkeit wie das Crockersarkom 180 besaß der *Ehrlichsche Mäuseascitestumor*, d. h. auch hier wirkten 9 von 14 geprüften

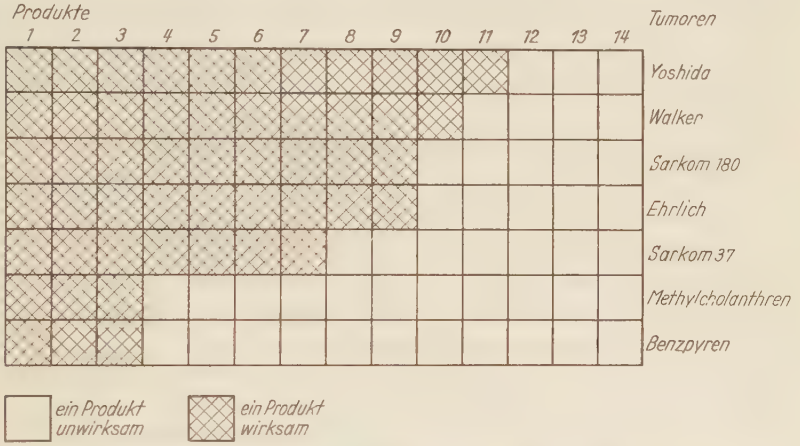


Abb. 8. *Empfindlichkeit von 7 bekannten Impftumoren von Ratten und Mäusen gegenüber 14 verschiedenen Cytostatica.* Am leichtesten wird der Yoshida-Tumor, am schwersten werden die Tumoren chemischer Genese beeinflußt

Substanzen. Vergleicht man die an diesem Tumor erzielten Ergebnisse mit den Befunden am Yoshida-Ascitestumor, so ergibt sich bei fast völlig gleicher Versuchsanordnung an beiden Ascitestumoren eine fast gleiche Zahl an wirksamen Produkten. Während es jedoch am Yoshida-Tumor der Ratte mit mehreren Cytostatica gelang, ein Angehen des Tumors völlig zu verhindern, die Tiere also zu heilen, starben sämtliche mit den verschiedenen Cytostatica behandelten Ascitesmäuse innerhalb von höchstens 8 Wochen — teilweise unter eigenartiger Umwandlung des Tumorcharakters. Der Ehrlichsche Mäuseascitestumor ist also zwar relativ leicht zu beeinflussen, in seinem Angehen aber in keinem Falle zu hindern, geschweige denn zu heilen.

Das *Mäusesarkom 37*, das sich makroskopisch und histologisch nicht vom Sarkom 180 unterscheidet und bei dem auch Versuchs- und Auswertungstechnik völlig identisch waren, zeigte bei unseren vergleichenden Untersuchungen eine etwas geringere Empfindlichkeit als der Mäuseascitestumor und das Sarkom 180: Alle Substanzen, die das Sarkom 37

beeinflußten, waren auch am Sarkom 180 wirksam, während die am Sarkom 37 wirkungslosen Produkte Myleran und 6-Mercaptopurin noch imstande waren, das Wachstum des Sarkoms 180 zu hemmen. Das Sarkom 37 ist also von unseren Mäusetumoren am schwersten zu beeinflussen.

Die therapieresistentesten Impftumoren waren das *Benzpyren- und das Methylcholanthrensarkom der Ratte,* also die primär durch chemische Substanzen erzeugten Geschwülste. An diesen Tumoren hatten nur je 3 von 14 getesteten Substanzen eine hemmende Wirkung. Aber nicht nur die Zahl der wirksamen Produkte, sondern auch die Stärke der erreichbaren Wachstumshemmung war geringer als bei allen übrigen Tiertumoren. Sie lag bei verträglichen Dosen immer unter 75% („mäßig wirksam").

Diese schwerere Beeinflußbarkeit unserer „chemischen" Tumoren könnte vielleicht dadurch erklärt werden, daß sie im Gegensatz zu unseren übrigen Impftumoren auf dem gleichen Tierstamm (Sprague-Dawley-Ratten) weitergezüchtet und zu Chemotherapieversuchen verwendet wurden, auf dem sie primär entstanden waren. Sie könnte aber auch eine charakteristische Eigenschaft aller festen Impftumoren sein, die primär durch Einwirkung *cancerogener Kohlenwasserstoffe* entstanden sind. *Für* eine solche Annahme scheint die Tatsache zu sprechen, daß auch das Lewis-Sarkom T 241 der Maus, ein primär durch lokale Applikation von Dibenzanthrazen erzeugter Impftumor, sehr schwer zu beeinflussen ist: So konnte Sugiura bei der Testung von mehr als 300 Substanzen, die an anderen Impftumoren teilweise eine ausgezeichnete Wirkung besaßen, an diesem Tumor keine oder nur sehr schwache Wachstumshemmungen erzielen. Schmidt berichtet dagegen über relativ gute Wirkungen bei Testung an seinen — allerdings meist intramuskulär verimpften — „chemischen Tumoren" (Benzpyren- und 2-Aminofluoren-Sarkom).

Der besonders leicht zu beeinflussende Yoshida-Tumor der Ratte wurde zwar primär ebenfalls durch Verabreichung chemischer Substanzen (Fütterung mit 4′-Amino-2,3′-dimethyl-azo-benzol und Pinselung mit Kaliumarsenitlösung) erzeugt. Er gehorcht in seiner Ascitesform jedoch wohl eigenen Gesetzen und ist mit den in fester Form gezüchteten „chemischen" Tumoren sicher nicht zu vergleichen.

B. Wirkungsbreite der einzelnen Cytostatica (s. Abb. 9)

Colchicin hemmte bei unseren Untersuchungen keinen der 5 festen Tumoren, während es an den beiden Ascitestumoren eine recht starke Wirkung besaß und den Mäuseascitestumor sogar besser als sämtliche übrigen Substanzen beeinflußte. Es war jedoch mit Colchicin nicht möglich, das Angehen der beiden Ascitestumoren zu verhindern oder sie zu heilen. Das Produkt, das sich bei neoplastischen Erkrankungen des Menschen nicht bewährt hat, besitzt also auch im Tierversuch ein relativ enges und einseitiges Wirkungsspektrum.

Desacetylmethylcolchicin, das sich bei der chronischen myeloischen Leukämie des Menschen gut bewährt haben soll, wesentlich ungiftiger ist, als Colchicin und in vitro zu den gleichen Mitosestörungen wie dieses Produkt führt, versagte zu unserer Überraschung als einziges Cytostaticum an *sämtlichen* von uns verwendeten Tiertumoren. Selbst an den beiden durch Colchicin sehr gut zu beeinflussenden Ascitestumoren war es wirkungslos! Zu ähnlichen Ergebnissen kamen am Mäuseascitestumor

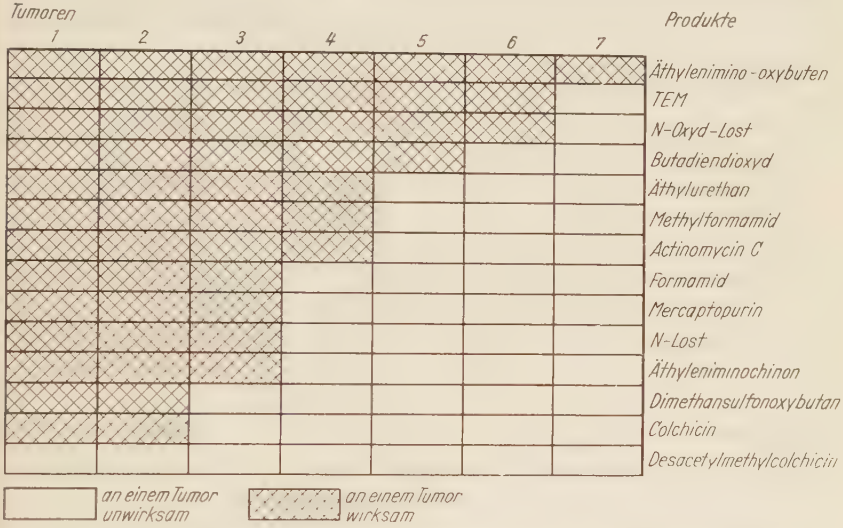


Abb. 9. *Wirkungsbreite von 14 zumeist bekannten Cytostatica an 7 Impftumoren von Ratten und Mäusen.* Desacetylmethylcolchicin beeinflußt keinen, Äthylenimino-oxybuten hemmt alle verwendeten Impftumoren

Lettré (1955) sowie Homann und Otto. Auch Schär, Loustalot und Gross, die ersten Untersucher der Substanz, weisen darauf hin, daß Desacetylmethylcolchicin bei kurzdauernder Anwendung an mehreren Tiertumoren erst in toxischen Dosen eine wachstumshemmende Wirkung besitze. Vorläufig scheint also bei Desacetylmethylcolchicin zwischen klinischen und experimentellen Ergebnissen eine gewisse Diskrepanz zu bestehen.

Das bei neoplastischen Erkrankungen des Menschen ebenfalls wirksame, wenn auch heute weniger verwendete *Äthylurethan* hatte bei unseren Untersuchungen am Walker-Tumor eine ausgezeichnete, an den beiden Mäusesarkomen und am Yoshida-Tumor eine mittlere, am Mäuseascitestumor und an den beiden „chemischen" Rattentumoren dagegen gar keine Wirkung. Es besitzt also ein mittleres Wirkungsspektrum.

Die beiden *Formamide* beeinflußten in unseren Tierversuchen praktisch nur die 3 Mäusetumoren. Lediglich am Yoshida-Tumor der Ratte

war eine relativ schwache Wirkung von N-Methylformamid zu registrieren. Wie schon Clarke u. Mitarb. (1953) am Sarkom 180 feststellten, hatte interessanterweise N-Methylformamid an diesem, und wie unsere weiteren Versuche zeigten, auch an den beiden anderen Mäusetumoren eine stärkere wachstumshemmende Wirkung als das nicht substituierte Formamid.

Überraschend stark war die Wirkung von *Butadiendioxyd*, das beim Menschen bisher therapeutisch noch nicht eingesetzt worden ist. Es gehörte bei unserer vergleichenden Prüfung zu den 4 Substanzen mit dem breitesten Wirkungsspektrum: Es hemmte 5 von 7 Tiertumoren, darunter sogar das außerordentlich schwer zu beeinflussende Benzpyrensarkom der Ratte. Im Gegensatz zu Stock (1954) konnten wir für Butadiendioxyd auch am Sarkom 180 eine (wenn auch geringe) Wirkung feststellen.

Das beim Menschen nach klinischen Berichten gut wirksame *Myleran* hatte im Tierversuch ein enges Wirkungsspektrum: Es erwies sich lediglich am Sarkom 180 und am Walker-Tumor als mäßig wachstumshemmend, während es bei allen übrigen Tiertumoren versagte. Es ergab sich also die — vielleicht zufällige — Übereinstimmung, daß Myleran und Desacetylmethylcolchicin, die beim Menschen im gleichen Indikationsbereich (bei der chronischen myeloischen Leukämie) offenbar mit Erfolg eingesetzt werden, bei den von uns zur Testung verwendeten Tiertumoren relativ schlecht abschnitten oder sogar versagten.

Etwas breiter war das Wirkungsspektrum des — besonders bei der akuten Leukämie des Menschen angewandten — Produktes 6-Mercaptopurin, das am Sarkom 180 und am Yoshida-Tumor eine ausgezeichnete, am Walker-Tumor eine mäßige Wachstumshemmung bewirkte, bei den übrigen Tiertumoren aber versagte.

Das beim Menschen offenbar lediglich in einem relativ kleinen Indikationsbereich (bei der Lymphogranulomatose) wirksame *Actinomycin C* hatte bei unseren Tierversuchen ein mittleres Wirkungsspektrum: Es beeinflußte 4 von 7 Tiertumoren, darunter allerdings überraschenderweise auch den so schwer zu beeinflussenden Benzpyrentumor der Ratte.

Bei einem Vergleich der beiden am Menschen bewährten *Lost-Präparate* konnten wir die Angaben japanischer (Yoshida und Ishidate) und deutscher Forscher (Druckrey) über die gegenüber N-Lost bedeutend geringere Toxicität und stärkere antineoplastische Wirkung von N-Oxyd-Lost bestätigen: N-Lost hemmte nur 3 von 7, N-Oxyd-Lost dagegen 6 von 7 Impftumoren. *N-Oxyd-Lost* gehört damit neben *Triäthylenmelamin*, das sich beim Menschen ebenfalls bewährt hat und dessen Wirkungsspektrum bei unserer vergleichenden Prüfung fast völlig der von N-Oxyd-Lost entsprach, zu den wirksamsten Antineoplastica.

Äthylenimino-benzochinon, dessen Bis-alkoxy-Derivat zur Zeit als „E 39" noch klinisch geprüft wird (Wolf und Gerlich), fiel gegenüber

diesen Produkten in unseren Tierversuchen wesentlich ab. An unseren Tiertumoren konnten wir also die günstigen Befunde von Domagk nicht bestätigen. Nach unseren — allerdings nur orientierenden — Versuchen an Mäusetumoren scheint sich das Alkoxyderivat in seiner antineoplastischen Wirkung nicht wesentlich von Äthylenimino-benzochinon zu unterscheiden.

Das breiteste Wirkungsspektrum von sämtlichen von uns geprüften Cytostatica zeigte *Äthylenimino-oxybuten*, das an *allen* von uns zur Testung verwendeten Impftumoren, also auch an den beiden außerordentlich schwer zu beeinflussenden „chemischen" Tumoren, eine ausgezeichnete wachstumshemmende Wirkung zeigte.

Diese Ergebnisse sind, abgesehen von ihrer möglichen Bedeutung für die Humantherapie, deshalb besonders interessant, weil bisher auf Grund der ausgedehnten Untersuchungen von Walpole u. Mitarb. angenommen wurde, daß nur solche Äthylenimine eine deutliche antineoplastische Wirkung besitzen, die *2 oder mehr* Äthylenimingruppen im Molekül aufweisen. Mit Äthylenimino-oxybuten wurde also erstmals ein *Mono*äthylenimin gefunden, dessen wachstumshemmende Wirkung nicht nur der von Bis- oder Polyäthyleniminen gleichkommt, sondern sie sogar übertrifft.

Die wichtigste Erkenntnis aus unseren Versuchen scheint uns zu sein, daß ein Produkt mit einer so einfachen Struktur eine so umfassende antineoplastische Wirkung besitzt, die — wie in einer späteren Veröffentlichung gezeigt werden soll — in charakteristischer Weise von den einzelnen Strukturelementen abhängt.

Zusammenfassung

1. 14 meist bereits klinisch angewandte Cytostatica von verschiedener chemischer Struktur wurden bei völlig gleicher Versuchsanordnung an 7 verschiedenen Impftumoren von Maus und Ratte auf ihre antineoplastische Wirkung untersucht. Dadurch war sowohl eine Beurteilung der Empfindlichkeit verschiedener Tiertumoren gegen Cytostatica als auch eine Beurteilung der Wirkungsbreite der einzelnen Substanzen möglich.

2. Am leichtesten waren der Yoshida- und der Walker-Tumor der Ratte, am schwersten die primär durch chemische Substanzen erzeugten Impftumoren der Ratte zu beeinflussen, während die Mäusesarkome 37 und 180 sowie der Ehrlichsche Mäuseascitestumor eine „mittlere Empfindlichkeit" zeigten.

3. Desacetylmethylcolchicin war überraschenderweise an keinem Tumor wirksam. Relativ schmal war das Wirkungsspektrum von Colchicin, Myleran, Äthyleniminobenzochinon, N-Lost, 6-Mercaptopurin und Formamid. Eine mittlere Wirkungsbreite zeigten Actinomycin C, Methylformamid und Äthylurethan. Sehr stark wirksam waren

Butadiendioxyd, N-Oxyd-Lost und TEM. Äthylenimino-oxybuten war als einziges von sämtlichen untersuchten Produkten an allen 7 Tiertumoren ausgezeichnet wirksam.

4. Die etwaige Bedeutung dieser tierexperimentellen Befunde für den Menschen wird diskutiert.

Literatur

Bertrand-Fontaine, B., J. Mallarmé, J. Schneider u. J. Debray: Presse méd. **1954**, 737. — Bock, H. E., u. R. Gross: Klin. Wschr. **1953**, 816. — Ärztl. Wschr. **1954**, 344. — Bollag, W.: Schweiz. med. Wschr. **1953**, 872, 1027. — Bollag, W., u. A. F. Esselier: Schweiz. med. Wschr. **1954**, 1174. — Brockmann, H., u. N. Grubhofer: Naturwissenschaften **36**, 376 (1949); **37**, 494 (1950). — Burchenal, J. H., M. L. Crossley, C. Ch. Stock and C. P. Rhoads: Arch. of Biochem. a. Biophysies **26**, 321 (1950). — Burchenal, J. H., D. A. Karnofsky, L. Murphy, R. R. Ellison and C. P. Rhoads: Cancer Res. **1**, 7 (1953). — Burchenal, J. H., D. A. Karnofsky, M. L. Murphy, R. R. Ellison, M. P. Sykes, C. T. C. Tan, A. C. Memrann, M. Yuceoglu and C. P. Rhoads: Amer. J. Med. Sci. **228**, 371 (1954). — Clarke, D. A., Philips, F. S., St. S. Sternberg, R. K. Barclay and C. Ch. Stock: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **84**, 203 (1953). — Clarke, D. A., F. S. Philips, St. S. Sternberg, C. Ch. Stock and G. B. Elion: Cancer Res. **13**, 9, 593 (1953a). — Croizat, P.: Presse med. **1954**, 738. — Domagk, G., S. Petersen u. W. Gauss: Z. Krebsforsch. **59**, 617 (1954). — Domagk, G.: Dtsch. med. Wschr. **1956**, 801. — Druckrey, H.: Dtsch. méd. Wschr. **1954**, 1667. — Klin. Wschr. **1955**, 784. — Druckrey, H., D. Schmähl, P. Danneberg, K. Kaiser, N. A. Nieper, H. W. Lo, R. Mecke, J. v. Einem u. W. Dischler: Arzneimittel-Forsch. **6**, 539—550 (1956). — Dudik, E.: Ärztl. Wschr. **1956**, 215. — Friederici, I.: Ärztl. Forsch. **10**, I/527 (1956). — Galton, D. A. G.: Lancet **1953**, 208. — Galton, D. A. G., and M. Till: Lancet **1955**, 425. — Hackmann, Ch.: Z. Krebsforsch. **58**, 607 (1952). — Haddow, A. and Sexton, W. A.: Nature. (Lond.) **157**, 500 (1946). — Haddow, A., and G. M. Timmis: Lancet **1953**, 207. — Heilmeyer, L.: Grundlagen und Praxis chemischer Tumorbehandlung. 2. Freiburger Symposion. S. 204—217, Springer 1954. — Hendry, J. A., J. L. Rose and A. L. Walpole: Brit. J. Pharmacol. **6**, 201 (1951). — Hendry, J. A., R. F. Homer, F. L. Rose and A. L. Walpole: Brit. J. Pharmacol. **6**, 235 (1951); **6**, 357 (1951a). — Hörlin, W., u. W. Schmitt: Dtsch. med. Wschr. **1957**, 247—250. — Homann, W., u. H. Otto: Z. Krebsforsch. **60**, 730 (1955). — Huguenin, R., Truhaut, R., et J. S. Bourdin: Presse méd **1954**, 740. — Jackson, H.: Brit. J. Canc. **8**, 336 (1954). — Jacobj, A.: Arch. exper. Path. Pharmacol. **27**, 129 (1890). — Karnofsky, D. A., J. H. Burchenal, G. C. Armistead, C. M. Southam, J. L. Bernstein, L. F. Craver, and C. P. Rhoads: Arch. Int. Med. **87**, 477 (1951). — Kimura, K., H. Torigoe, K. Ota and S. Torii: Nagoya J. Med. Sci. **15**, 244 (1952). — Kneedler, W. H.: J. Amer. Med. Assoc. **129**, 272 (1945). — Kurokawa, T.: Chiryo Clin. Mag. **34**, 10 (1952). — Lehmann, F. E.: Experientia (Basel) **3**, 223 (1947). — Lettré, H.: Erg. Physiol. **46**, 379 (1950). — Zschr. Krebsforsch. **59**, 287 (1953). — Cancer Res. **2**, 125 (1955). — Litchfield, J. T., and F. W. Wilcoxon: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 99 (1949). — Martin, H.: Klin. Wschr. **1954**, 518. — Martin, R., et J. Munier: Presse méd. **1954**, 741. — Moeschlin, S., H. Meyer u. A. Litchman: Schweiz. med. Wschr. **1953**, 990. — Oettel, H.: Arch. Pharmaz. **24**, 67—69 (1954). — Grundlagen und Praxis chemischer Tumorbehandlung. 2. Freiburger Symposion; S. 260. Springer 1954a. — Oettel, H., u. G. Wilhelm: Arzneimittel-Forsch. **4**, 691 (1954). — Oettel, H., u. H. Zeller: Unveröffentlichte Versuche. —

Paterson, E., J. Thomas, A. Haddow and J. M. Watkinson: Lancet **1946**, 677. — Paul, J. T., W. O. Brown and L. R. Linarzi: Amer. J. Clin. Path. **11**, 210 (1941). — Pernice, B.: Sicilia med. **1**, 265 (1889). — Philips, F. S., St. S. Sternberg, D. A. Clarke and G. H. Hitchings: Cancer Res. **1**, 42 (1953). — Raettig, H., u. W. Uecker: Naturwissenschaften **42**, 490 (1955). — Rauen, H. M.: Vergleichend biochemische Fragen. 6. Koll. d. Ges. f. physiol. Chem. 20/22. 4. in Mosbach. Springer 1956. — Rose, F. L., J. A. Hendry and A. L. Walpole: Nature (Lond.) **165**, 993 (1950). — Santavy, F., u. T. Reichstein: Helvet. chim. Acta. **33**, 1606 (1950). — Schär, B., P. Loustalot u. F. Gross: Klin. Wschr. **1954**, 49. — Schmidt, K. H.: Arzneimittel-Forsch. **4**, 146 (1954). — Schulte, G.: Z. Krebsforsch. **58**, 500 (1952). — Schulte, G., u. H. Lings: Strahlenther. **90**, 301 (1953). — Schulten, H., u. W. Pribilla: Med. Klin. **1955**, 1631. — Schulze, W.: Dtsch. med. Wschr. **1957**, (im Druck). — Stahmann, M. A., u. M. Bergmann: J. Org. Chem. **11**, 586 (1946). — Stock, C. Ch.: Amer. J. Med. **8**, 658 (1950). — Advances in Cancer Res. **2**, 426 (1954). — Current Res. in Cancer Chemother., Rep. Nr. 3—55 (Aug. 1955). Iss. by the Nat. Advisory Canc. Council. — Sugiura, K.: Cancer Res. **3**, 18 (1955). — Vierling, K., H. Oettel u. G. Wilhelm: Dtsch. Patent-Anmeldung 1004614 vom 26. 6. 1954 (Bekanntmachung vom 21. 3. 1957). — Walpole, A. L.: Brit. J. Pharmacol. **6**, 135 (1951). — Warburg, O.: zit. nach Bollag: Röntgen- und Laborat. Prax. **8**, 128 (1955). — Wolf, H. J., u. N. Gerlich: Dtsch. med. Wschr. **1956**, 806. — Yoshida, T.: J. Nat. Canc. Instit. **12**, 947 (1952). — Yoshida, T., u. M. Ishidate: Gann **41**, 93 (1950).

Prof. Dr. H. Oettel, Gewerbehygienisch-Pharmakologisches Institut der Badischen Anilin- und Soda-Fabrik, Ludwigshafen a. Rhein